

N° ORDRE : 3422

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par Céline CHOLLET

Pour obtenir de grade de

DOCTEUR

Spécialité : Polymères

**INTERET DE LA MAITRISE DE
LA MICROTOPOCHIMIE SUPERFICIELLE POUR
CONTROLLER LES INTERACTIONS MATERIAUX-TISSUS**

Soutenue le

3 octobre 2007

Après avis de :

Mme MARCHAND-BRYNAERT J.	Professeur à l'Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Mme MIGONNEY V.	Professeur à l'Université Paris 13	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mme MARCHAND-BRYNAERT J.	Professeur à l'Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Mme MIGONNEY V.	Professeur à l'Université Paris 13	Rapporteur
M. GUIGNANDON A.	Maître de conférence, Université Jean Monnet	Examineur
M. GRANJA P.	Assistant de recherche à INEB, Porto	Examineur
Mme HEROGUEZ V.	Directrice de recherche CNRS	Examineur
M. LAZARE S.	Directeur de recherche CNRS	Examineur
Mme DURRIEU M-C.	Chargée de recherche INSERM	Directeur
M. GUILLEMOT F.	Chargé de recherche INSERM	Directeur

*“Learn from the mistakes of others,
you can never live long enough to make them all yourself”*

John Luther

A ma mère et mon père,

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans votre présence et vos encouragements, je vous le dédie

A Fabien,

Merci de m'avoir soutenue dans toutes mes décisions

A tous mes amis

Merci d'avoir été là pour moi

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse se sont déroulés au sein du laboratoire "Biomatériaux et Réparation tissulaire", Unité 577 INSERM sous la direction successive de Laurence Bordenave et de Joëlle Amédée. Je tiens à leur adresser mes remerciements pour m'avoir accueillie dans le laboratoire.

Je tiens à adresser ma sincère et profonde reconnaissance à Marie-Christine Durrieu, chargée de recherche à l'INSERM, pour avoir dirigé cette thèse et pour son aide précieuse qui m'a été indispensable. Je tiens à la remercier pour avoir toujours cru en ma motivation ainsi que pour la sympathie et la confiance qu'elle m'a témoignées au cours de ces trois années de thèse.

J'associe à ces remerciements Fabien Guillemot, Chargé de Recherche à l'INSERM, pour ses conseils et son esprit critique.

Je remercie tous les membres du jury pour l'intérêt porté à mon travail et leur exprime ma profonde gratitude.

Je suis très honorée de la présence dans ce jury de Mme Véronique Migonney, Professeur à l'Université Paris-Nord, et Jacqueline Marchand-Brynaert, Professeur à l'Université catholique de Louvain, qui ont accepté d'être rapporteurs de mon travail.

Je tiens également à remercier Sylvain Lazare, Directeur de recherche au CNRS, d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de m'avoir guidée dans l'utilisation du laser à excimères.

Valérie Héroguez, Directrice de recherche au CNRS et Alain Guignandon, Maître de Conférence à l'Université Etienne Monnet pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Mes plus vifs remerciements vont à Pedro Granja, Assistant de Recherche à l'Instituto de Engenharia Biomédica à Porto, pour les fructueuses discussions que nous avons eues, les nombreux conseils qu'il m'a prodigués et pour m'avoir convaincue de me former à la culture cellulaire.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance envers Monsieur Mario Barbosa pour son accueil au sein du laboratoire INEB.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de cette thèse, et plus particulièrement :

- Christine Labrugère, Ingénieur à l'Institut de Chimie et de la Matière Condensée de Bordeaux, pour la réalisation des analyses XPS et pour sa disponibilité,

- Brigitte Brouillaud, Maître de Conférence à l'Université Bordeaux 2, et Nicole Barthe, Maître de Conférence à l'Université Bordeaux 2 Praticienne Hospitalière, pour leur aide à la réalisation des analyses réalisées avec le μ -imager,
- Chantal Bourget, Assistante Ingénieur à l'U.577 INSERM, pour son aide en biologie moléculaire, son soutien, nos nombreuses discussions (toujours animées!) mais surtout pour sa mauvaise foi légendaire,
- Murielle Rémy, Ingénieur de Recherche à l'U.577 INSERM, pour sa patience, ses nombreux conseils et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions,
- Reine Bareille, Ingénieur de Recherche à l'U.577 INSERM, pour son aide en culture cellulaire ainsi que pour ses charlottes au chocolat,
- Christel Chanseau, Assistante Ingénieur à l'U.577 INSERM, pour sa bonne humeur, son investissement dans ce travail mais surtout pour le soutien qu'elle a su m'apporter au cours de ces 3 années.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire de l'U.577 pour leur accueil amical et chaleureux, et sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

J'exprime un grand merci à tous ceux avec qui j'ai partagé d'excellents moments au laboratoire et en dehors!

Maritie, tiveste o difícil labor de me aturar no quarto (e na cama !!) durante 3 meses. Estiveste sempre presente, o que não foi o caso das células, e foste de uma grande ajuda durante a minha tese. Un grande obrigada por tudo !!

Fanny, je te remercie pour ta bonne humeur, ta franchise (parfois un peu gaffeuse !) et pour tous les bons moments passés ensemble.

Guillaume, je te remercie pour ta patience, ton éternel optimisme et ta grande capacité d'écoute.

A tous les trois, bon courage pour votre dernière année.

Je souhaite enfin remercier mes amis, Anne-Sophie, Virginie, Guillaume et Xavier pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant la rédaction de ce mémoire. Merci d'avoir été là...

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	8
INTRODUCTION	10
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. Les substituts utilisés en chirurgie osseuse et vasculaire	13
A) Les greffes	13
(1) Les autogreffes	13
(2) Les allogreffes	14
(3) Les xélogreffes	16
B) Les biomatériaux	17
(1) Définition	17
(2) Les matériaux métalliques	17
(a) Les aciers inoxydables	19
(b) Les alliages Chrome-Cobalt	20
(c) Les alliages de titane	20
(3) Les céramiques et les verres	21
(a) Les céramiques bioinertes	21
(b) Les céramiques bioactives et les bioverres	22
1- Les céramiques bioactives	22
2- Les verres bioactifs	23
(4) Les matériaux polymères	23
(a) Le polyéthylène téréphtalate	24
(5) Choix d'un matériau pour une application médicale	26
(6) Quels sont les problèmes liés à l'implantation des biomatériaux ?	27
C) L'ingénierie tissulaire	29
(1) Généralités	29
(2) La thérapie cellulaire	30
(3) La reconstruction tissulaire in vitro	31
(4) Concept des matériaux hybrides	33
(a) Chirurgie orthopédique	33
(b) Chirurgie vasculaire	35
II. Quelles sont propriétés physico-chimiques superficielles des matériaux influençant l'adhésion cellulaire?	37
A) Paramètres morphologiques	37
(1) Porosité	37
(2) Rugosité	39
(3) Microstructuration de la surface	40
B) Paramètres physico-chimiques	41
(1) Caractère hydrophile/hydrophobe	41
(2) Charge de surface	43
(3) Composition chimique	44
C) Paramètres biologiques	45
(1) Incorporation de facteurs de croissance	45
(2) Incorporation de molécules adhésives	46
III. Le peptide RGD	47
A) Généralités	47
B) Mécanismes de l'adhésion cellulaire	51
(1) Les plaques d'adhésion focale	51
(2) Les protéines de signalisation intracellulaire associées au contact focal	53
C) Modification de surfaces par les peptides RGD	55
(1) Revêtement ou greffage de peptides ou de protéines contenant la séquence RGD	55

(2) Peptides ou protéines ? _____	56
D) Les différents peptides contenant la séquence RGD _____	57
(1) Les peptides linéaires _____	57
(2) Les peptides cycliques _____	58
(3) Les mimes peptidiques _____	58
E) Intérêt d'un bras espaceur entre le RGD et le matériau _____	59
F) Greffage de peptides RGD à la surface d'un matériau _____	60
(1) Modification de la surface des polymères _____	60
(a) Modifications du polyéthylène téréphtalate (PET) _____	61
3- Traitement par voie chimique _____	61
4- Dégradation enzymatique _____	62
5- Traitement plasma _____	63
6- Traitement aux UV _____	64
(b) Techniques de greffage des peptides _____	66
1- Peptides protégés _____	66
2- Peptides non protégés _____	67
3- Couplage chimique sélectif _____	69
G) Importance de la densité de peptides RGD en surface _____	70
H) Quels sont les outils qui permettent de quantifier la densité de peptides immobilisés en surface d'un matériau ? _____	71
(1) Dosage des acides aminés par des techniques colorimétriques _____	71
(a) Dosage direct _____	71
(b) Dosage indirect _____	73
(2) Dosage des acides aminés par l'utilisation de radioéléments _____	74
(a) Iodination radioactive _____	74
(b) Compteur à scintillation _____	74
(c) Imagerie bêta haute résolution _____	75
(3) Test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) _____	76
(4) Spectroscopie à photoélectrons X (XPS) _____	76
I) Importance de la distribution des peptides RGD en surface _____	77
IV. Micro- et nano-distribution de biomolécules en surface de matériaux _____	79
A) La lithographie optique _____	80
(1) Principe de la photolithographie _____	81
(2) Applications au dépôt de biomolécules _____	82
B) La photoablation par laser à excimères _____	83
(1) Principe _____	84
(2) Applications au dépôt de biomolécules _____	85
C) La lithographie molle _____	85
(a) Principe de l'impression par microcontact (μ CT) _____	86
(b) Applications au dépôt de biomolécules _____	86
1- Modelage indirect _____	86
2- Modelage direct _____	88
D) Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation - Direct Writing (MAPLE-DW) _____	88
(1) Principe _____	88
(2) Applications au dépôt de biomolécules _____	89
DEUXIEME PARTIE : ARTICLES _____	91
<i>QUELLE DENSITE DE PEPTIDES RGD IMMOBILISER EN SURFACE DE BIOMATERIAUX ? _____</i>	92
Introduction _____	93
Premier article _____	97
Deuxième article _____	98
<i>INFLUENCE DE LA DISTRIBUTION DES PEPTIDES RGD EN SURFACE DE BIOMATERIAUX SUR L'ADHESION CELLULAIRE _____</i>	99
Introduction _____	100
Troisième article _____	103

Quatrième article	104
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	105
LISTE DES FIGURES	110
LISTE DES TABLEAUX	112
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	116

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAA	Amino Acid Analysis
ADOT	Association pour le Don d'Organe et de Tissus humains
BCA	Acide Bicinchronique
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMP4	Bone Morphogenic Protein 4
CCD	Charge Couple Device
CDI	Carbonyl diimidazole
CML	Cellules Musculaires Lisses
CSMO	Cellules Stromales de la Moelle Osseuse
μCT	Impression par microcontact
Cyclo-DfKRG	Cyclo-(Asp-Phe-(Mercapto-propionyl-Lys)-Arg-Gly)
DCC	Dicyclohexyl-carbodiimide
DMPT	Diméthylparatoluidine
DSC	(N,N'-disuccinimidyl carbonate)
EDC	1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl)-carbo-diimide
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
GRGDSPC	Glycine – Arginine – Glycine – Acide aspartique – Sérine – Proline – Cystéine
GTP	Guanosine Triphosphate
HAP	Hydroxyapatite
HBDC	Human Bone Derived Cell
HPLC	High Precision Liquid Chromatography
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPLE-DW	Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation - Direct Writing
MC3T3	Mouse Calvaria 3T3
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MFA	Microscope à Force Atomique
NHS	N-hydroxysuccinimide

PE	Polyéthylène
PEG	Polyéthylène glycol
PET	Polyéthylène téréphtalate
PIP 5-Kinase	Phosphatidyl inositol 4-phosphate5-Kinase
PLA	Polyacide lactique
PGA	Poly(ϵ -caprolactone)
PLL	Poly(L-lysine)
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
POE	Polyoxyde d'éthylène
PS	Polystyrène
PTFEe	Polytétrafluoroéthylène expansé
REDV	Arginine – Glutamate – Acide aspartique – Valine
RGD	Arginine – Glycine – Acide aspartique
RGDC	Arginine – Glycine – Acide aspartique – Cystéine
RGDS	Arginine – Glycine – Acide aspartique – Sérine
SAM's	Self Assembled Monolayers
SMCC	Succinimidyl 4-(N-maleinimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)
TCP	Phosphate tricalcique
TETTA	Triéthylènetétramine
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TRAIL	TNF alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand
UHMWPE	Ultra High Molecular Weight Polyethylene
UV	Ultra Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy
YIGSR	Tyrosine – Isoleucine – Glycine – Serine – Arginine

INTRODUCTION

A l'heure actuelle, la perte ou le dysfonctionnement d'un organe ou d'un tissu est l'un des problèmes de santé les plus fréquemment rencontrés. Ce problème est d'autant plus important qu'il n'y a présentement aucune solution optimale face au nombre croissant de cas à traiter, malgré l'avancement des connaissances en sciences du vivant et en ingénierie. L'augmentation de la durée de vie, l'évolution des modes de vie ainsi que la volonté d'améliorer la qualité de vie des populations font que les domaines des transplantations d'une part, et des biomatériaux d'autre part, connaissent une période de forte croissance. Cependant, ces deux approches, destinées à remplacer ou à réparer les organes/tissus défectueux ne sont pas totalement infaillibles.

Le domaine de la transplantation consiste à remplacer un organe malade par un organe sain provenant du patient lui-même (autogreffe), d'un donneur appartenant à la même espèce (allogreffe) ou d'un donneur appartenant à une espèce différente (xénogreffe). Malgré les avancées considérables réalisées dans le cadre de la recherche médicale au cours des dernières années, la transplantation rencontre certains problèmes. L'inconvénient majeur provient de la pénurie d'organes causée par le faible nombre de donneurs et l'augmentation du nombre de patients en attente de greffon. Au-delà de la pénurie d'organes, il y a également un problème au niveau du taux de réussite des greffes, de plus, la qualité de vie des patients est diminuée par la prise chronique d'immunosuppresseurs. A ceci s'ajoute le fait qu'il existe depuis quelques années une réelle prise de conscience des risques de transmission virale et d'agents pathogènes liés à l'utilisation des allogreffes et des xénogreffes ainsi qu'à la disponibilité réduite des autogreffes. Finalement, la transplantation, provenant le plus souvent de donneurs cadavériques, entraîne l'impossibilité évidente de prévoir le moment de l'intervention, il n'est donc pas possible de traiter les patients au moment idéal selon leur état.

Le secteur des biomatériaux regroupe de nombreux produits, généralement issus de technologies et de matériaux initialement développés pour d'autres applications que le domaine médical. Ces matériaux englobent les polymères, les métaux, les céramiques ainsi que les matériaux composites. Un des inconvénients majeurs rencontré lors de l'utilisation de biomatériaux est que leur durée de vie est presque toujours inférieure à celle du patient, ce qui nécessite, dans de nombreux cas, une réintervention. Ceci est premièrement causé par l'usure des matériaux employés, aucun matériau synthétique n'ayant une durée de vie infinie. Une

autre cause majeure vient du fait, qu'à l'heure actuelle, il n'existe aucun matériau totalement biocompatible, c'est-à-dire présentant une parfaite interaction entre sa surface et les cellules du tissu receveur. De plus, l'utilisation des biomatériaux engendre souvent la nécessité d'un traitement à vie. Par exemple, un patient ayant reçu une prothèse vasculaire sera soumis, à vie, à une prise quotidienne d'antiagrégant plaquettaire. Le dernier problème vient du manque d'adaptabilité des biomatériaux nécessitant souvent une nouvelle intervention chirurgicale. Ceci est particulièrement le cas chez les enfants et les adolescents en pleine croissance.

Pour faire face aux problèmes liés à l'utilisation des biomatériaux et des transplantations, les chercheurs issus des sciences du vivant et des sciences de l'ingénieur ont uni leurs connaissances afin de créer une nouvelle discipline: l'ingénierie tissulaire. Ce concept a pour objectif de régénérer un organe ou un tissu en faisant appel à la biologie cellulaire et moléculaire ainsi qu'à la chimie des matériaux.

Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans le cadre de l'ingénierie tissulaire et propose la réalisation d'un tissu artificiel hybride associant une composante artificielle matricielle d'origine synthétique et une composante cellulaire. Idéalement, un tel matériau devrait être capable d'assurer de façon transitoire la fonction du tissu qu'il remplace, en induisant la régénération du tissu et en assumant son rôle physiologique. Cependant un tel matériau requiert une colonisation cellulaire rapide. Il est donc nécessaire d'augmenter sa biocompatibilité par le biais de modifications chimiques, physiques ou biologiques afin de rendre sa surface plus « attractive » pour l'adhésion cellulaire.

Le travail sera mené sur un matériau couramment utilisé en chirurgie vasculaire, le polyéthylène téréphtalate (PET), servant ici de surface modèle. L'objectif de ce projet est de rendre bioactif le PET par des modifications de surface, et plus particulièrement par le greffage covalent d'un peptide contenant la séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) reconnue pour favoriser l'adhésion cellulaire. Afin de stimuler la biointégration du PET et de contrôler au mieux les interactions surface/cellules, différentes stratégies de fonctionnalisation de surface seront envisagées dans cette étude.

Premièrement nous nous intéresserons à l'influence de la densité de peptides RGD immobilisés en surface du PET sur l'adhésion de cellules ostéoblastiques de souris (MC3T3). Pour cela nous modifierons la surface du PET par le biais de 4 méthodes chimiques et/ou physiques différentes afin d'y greffer des peptides RGD en densités variables et contrôlées. De nombreux outils méthodologiques physico-chimiques seront utilisés afin de contrôler la

fixation covalente des peptides en surface du biomatériau. Afin d'évaluer la densité de peptides greffés sur le PET, nous utiliserons une technique originale basée sur la quantification d'acides aminés radiomarqués par imagerie bêta à haute résolution. Le comportement cellulaire sera suivi par une évaluation colorimétrique de la quantité de cellules adhérentes ainsi que par l'observation et la quantification, après immunomarquage, des contacts focaux formés.

Dans un deuxième temps, notre étude consistera en l'élaboration de surfaces à microtopochimie superficielle contrôlée. En d'autres termes il s'agira d'élaborer des matériaux dont la surface sera caractérisée par une distribution des peptides RGD en microdomaines et non plus de façon homogène. Pour cela, nous utiliserons deux méthodes de microfabrication différentes : la photoablation utilisant un laser à excimères et la photolithographie. Les différents domaines obtenus seront caractérisés par microscopie électronique à balayage, microscopie optique, profilométrie optique ainsi que par imagerie bêta à haute résolution. La mise en culture de cellules MC3T3 sur ces surfaces sera suivie d'une étude morphologique afin de déterminer l'impact de la microstructuration des molécules adhésives sur l'adhésion cellulaire.

La réalisation de tels matériaux pourrait ainsi permettre de comprendre et de contrôler les phénomènes se produisant à l'interface cellule/surface.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les substituts utilisés en chirurgie osseuse et vasculaire

A) Les greffes

Actuellement, les techniques de greffes sont couramment mises en œuvre par les praticiens hospitaliers lors d'interventions chirurgicales, l'objectif étant de remplacer l'organe/tissu défectueux par un organe/tissu sain, le greffon. Il existe aujourd'hui trois grands types de greffe : les autogreffes, les allogreffes et les xéno-greffes.

(1) Les autogreffes

Autogreffe est le terme employé lorsque le donneur et le receveur sont le même individu. Ce type de greffe présente des avantages biologiques indiscutables, le greffon est en effet parfaitement compatible et intégré et ce type d'intervention ne comporte pas de risque de rejet. C'est pour cette raison que l'autogreffe est privilégiée dès que la situation du patient le permet.

Par exemple, l'autogreffe de moelle osseuse est pratiquée chez les individus atteints par une maladie sanguine ou immunitaire grave, telle qu'une leucémie, un déficit immunitaire ou une aplasie médullaire. Dans ce cas, la moelle est prélevée chez le malade pendant une phase de rémission de sa maladie. Dans un deuxième temps, après le prélèvement, la moelle est traitée de façon à éliminer les cellules malignes restantes. Elle est ensuite traitée par un procédé de cryoconservation. La technique de l'autogreffe de moelle osseuse consiste alors à injecter au patient malade la moelle osseuse saine lors d'une éventuelle poussée de sa maladie.

L'autogreffe osseuse se pratique également, dans ce cas le prélèvement se fait dans la partie supérieure de l'os iliaque, la crête. Une fois ce prélèvement effectué, il est utilisé afin de combler l'os endommagé. Les autogreffes sont aussi utilisées en dermatologie lorsque le patient présente une perte cutanée importante, c'est notamment le cas des grands brûlés. Dans ce cas le greffon est destiné à combler le déficit cutané. Les prélèvements sont effectués sur différentes parties du corps, essentiellement sur le bas-ventre, le cuir chevelu et les cuisses, en fonction de la superficie à restaurer. Une autre pratique couramment utilisée est l'autogreffe veineuse, essentiellement saphène interne, pour le remplacement des artères de petit et moyen

diamètre (artères coronaires). L'autogreffe veineuse constitue, à l'heure actuelle, le meilleur substitut artériel qui soit.

Cependant, l'autogreffe présente certains inconvénients non négligeables. Dans le cas de substitution osseuse, elle ne permet pas le comblement de grandes pertes de substances osseuses, et son prélèvement chez l'Homme est source de nombreuses complications post-opératoires au niveau du site comblé (infection, douleurs récurrentes, hernies, fractures secondaires...), mais aussi au niveau du site donneur. Dans le cas de substitution artérielle, son utilisation peut être limitée par une absence de veine due à une autre utilisation préalable ou à des lésions diffuses comme la thrombophlébite ou les varices.

(2) Les allogreffes

Les allogreffes sont les plus couramment employées, elles désignent le fait que le donneur et le receveur appartiennent à la même espèce. Les greffons sont alors prélevés sur des sujets vivants lors d'interventions chirurgicales ou sur des sujets morts depuis moins de douze heures.

Même si les allogreffes concernent le plus fréquemment les transplantations d'organes vivants tels que le rein, la moelle osseuse ou le cœur, elles peuvent cependant être utilisées dans le cadre d'un remplacement de tissus tels que le tissu osseux, les valves cardiaques, les vaisseaux sanguins ou la cornée.

En chirurgie ostéo-articulaire, les allogreffes se présentent essentiellement sous la forme d'os de banque. L'os de banque provient le plus souvent des *res nullius*. Il peut aussi être récolté sur cadavre dans des conditions d'asepsie très rigoureuses. Dans ce cas comme dans l'autre, cela impose une sélection drastique des donneurs et de nombreux examens complémentaires visant à prévenir toute contamination du receveur par un agent pathogène bactérien ou viral ou non conventionnel. Cet os est ensuite exposé à divers traitements. Il s'agit d'abord d'atténuer ou d'abolir le caractère immunogène du greffon sous peine d'encourir une réaction de rejet. Les techniques les plus courantes sont la lyophilisation et/ou la congélation à basse température. L'os de banque est ensuite stérilisé, en général par irradiation. Ces traitements reçus par les os de banque détruisent les cellules, dénaturent une fraction non négligeable de leurs protéines et altèrent leurs propriétés biologiques.

En chirurgie vasculaire, on distingue deux types de substituts biologiques issus d'allogreffes : les substituts biologiques naturels et les substituts biologiques modifiés. Le principal substitut biologique naturel est l'allogreffe artérielle. Ce type de greffe a été

développé en 1950 mais a pratiquement été abandonné après l'introduction des premières prothèses textiles synthétiques (Chakfe *et al.*, 2004). En effet, ce type de greffe présente une évolution quasi constante vers la dégradation à long terme. A l'heure actuelle elles sont tout de même préconisées dans le cadre du traitement des infections de prothèse avec rétablissement immédiat de la continuité vasculaire *in situ* et les revascularisations distales pour sauvetage de membre en l'absence de matériel autologue disponible. En ce qui concerne les substituts biologiques modifiés, les principales recherches se sont portées sur les veines de cordons ombilicaux. Un mandrin était introduit dans la lumière, puis la veine était réticulée par un traitement au glutaraldéhyde ou au dialdéhyde d'amidon. La veine ainsi traitée était introduite dans une manille de polyéthylène téréphtalate afin d'augmenter sa résistance mécanique. Cependant, son utilisation a été abandonnée par la majorité des chirurgiens à cause de son évolution fréquente vers la dilatation ou le développement d'anévrismes (Chakfe *et al.*, 2004).

Malgré de très bons résultats lors de la transplantation d'organes vivants, l'allogreffe rencontre certains problèmes. Le premier élément majeur est la pénurie d'organes humains. En 2006, en France, près de 12 400 personnes ont eu besoin d'une greffe d'organes et 229 patients sont décédés faute de greffon. Chaque année, le nombre de personnes inscrites sur liste d'attente est plus élevé (+ 4 % en 2006) et le décalage entre le nombre de nouveaux inscrits (5433 en 2006) et le nombre de greffes réalisées reste important (données fournies par l' Association pour le Don d'Organe et de Tissus Humains). Cette pénurie est essentiellement due au fait que, dans le cas des donneurs cadavériques, seulement deux pour cent de tous les décès répondent aux critères de la mort cérébrale avant l'arrêt du cœur.

Les réactions immunitaires constituent un risque majeur de rejet du greffon. Afin d'éviter les réactions immunes, les patients ayant subi une greffe voient leur qualité de vie diminuée par la prise chronique d'immunosuppresseurs. Même s'il est très faible, compte tenu de la sélection des donneurs et des examens de laboratoire préalable, il existe un risque de transmission d'agents infectieux comme le VIH. Ce risque se voit augmenter à cause de l'émergence de nouveaux agents infectieux "non conventionnels" tels que l'encéphalopathie spongiforme bovine et la maladie de Creutzfeld-Jacob. Finalement, la transplantation, provenant souvent de donneurs décédés entraîne l'impossibilité de traiter les patients au moment idéal selon leur état.

(3) Les xénogreffes

Les xénogreffes sont des greffes pratiquées avec un tissu ou un organe provenant d'une espèce différente de celle de l'organisme receveur. Le concept est très attractif car il met facilement à la disposition du chirurgien une variété anatomique très importante de types de greffes provenant d'animaux d'élevage. Même si à ce jour il n'existe aucun cas de survie après une xénotransplantation d'organes vivants, les xénogreffes de tissus trouvent de nombreuses applications notamment en chirurgie cardiaque et ostéo-articulaire. Il s'agit exclusivement de substituts biologiques traités. En effet, les xénogreffes non traitées ne sont plus employées depuis longtemps car elles étaient à l'origine d'une réaction immunologique qui excluait tout espoir de succès.

En chirurgie ostéo-articulaire, les xénogreffes utilisées pour le comblement des tissus osseux est essentiellement d'origine bovine. Les xénogreffes actuellement commercialisées font appel à des procédés chimiques de préparation visant à faire disparaître toute antigénicité, tout en conservant les qualités biologiques du tissu osseux. On les trouve sur le marché sous l'appellation Lubbock[®], Oxbone[®], Surgibone[®] et Orthoss[®].

La chirurgie cardiaque fait également appel à différents types de xénogreffes. Depuis plus de 20 ans, des prélèvements de porcs sont utilisés pour le remplacement des valves cardiaques. Ce type de valves ne nécessite alors pas de traitement anticoagulant, ce qui constitue un avantage majeur par rapport à l'utilisation de valves synthétiques. Néanmoins leur implantation ne peut excéder une dizaine d'année à cause de leur dégradation.

A l'heure actuelle la principale avancée dans le domaine des xénotransplantations a été réalisée par Klose *et al.* à Munich qui est parvenue à élever un porc TRAIL génétiquement modifié dont les organes sont à priori à l'abri des défenses immunitaires humaines. Ce porc TRAIL présente comme marqueur à la surface de ses cellules la protéine humaine "TNF alpha-related apoptosis-inducing ligand" (Klose *et al.*, 2005), elles sont ainsi protégées *in vitro* contre les cellules du système immunitaire humain. Cependant, il n'existe à ce jour aucune étude concernant la transplantation d'organes issus de porcs TRAIL chez l'humain.

B) Les biomatériaux

(1) Définition

Les biomatériaux ont été développés pour préserver l'intégrité et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles graves ou victimes de blessures ou de brûlures. L'objectif de leur développement est de permettre la fabrication de dispositifs d'assistance corporelle capables de suppléer les fonctions des organes lésés. Ils ne se définissent pas par une nature particulière mais par l'usage auquel on les destine. Leur caractéristique commune est la biocompatibilité, propriété dont le caractère multiparamétrique en fait une fonction difficile à mesurer ou à évaluer objectivement (Castner et Ratner, 2002). Ces variétés d'applications ont conduit la Conférence de Consensus, réunie à Chester (Grande Bretagne) à l'initiative de la Société européenne des Biomateriaux les 3 et 4 mars 1986, à définir un biomatériau comme : « *Les biomatériaux sont des matériaux non vivants interagissant avec les systèmes biologiques. Ils participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostic, à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou à celle d'un dispositif de suppléance fonctionnelle* ».

Une première génération de biomatériaux comprenait, jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, des métaux et alliages résistants à la corrosion utilisés en chirurgie dentaire et ultérieurement en chirurgie orthopédique. Les tissus ou tricots de polyester ont été utilisés après 1950 comme matériaux de prothèse vasculaire. Tous ces matériaux partagent la même caractéristique de n'avoir pas été produits spécifiquement pour des applications biomédicales. C'est secondairement que les propriétés de résistance à la corrosion, aux contraintes mécaniques et à l'usure, ainsi que leur relative inertie vis-à-vis des tissus vivants, ont été étudiées.

Il existe aujourd'hui trois grandes familles de matériaux : les matériaux métalliques, les matériaux céramiques et les verres, les matériaux polymères.

(2) Les matériaux métalliques

Les matériaux métalliques sont surtout utilisés en chirurgie orthopédique notamment pour des prothèses, de hanche ou de genou, ou des outils de fixation tels que des plaques, des vis ou des fils. Des alliages métalliques ont également été utilisés pour l'élaboration de valves cardiaques, de prothèses endovasculaires (stents) ou de stimulateurs cardiaques (pacemakers) (Figure 1).

Les principales propriétés prises en considération lors de la sélection d'un matériau métallique sont la biocompatibilité, les propriétés mécaniques et la résistance à la corrosion.

Dans la plupart des cas, trois différents groupes de métaux dominant dans le domaine des biomatériaux : l'acier inoxydable 316L, l'alliage Cobalt-Chrome-Molibdène Co-Cr-Mo et les alliages de titane, principalement l'alliage Ti-6Al-4V : Titane-Aluminium-Vanadium (Hanawa, 2002). Le tableau 1 présente la composition massique des principaux alliages utilisés comme implants chirurgicaux.

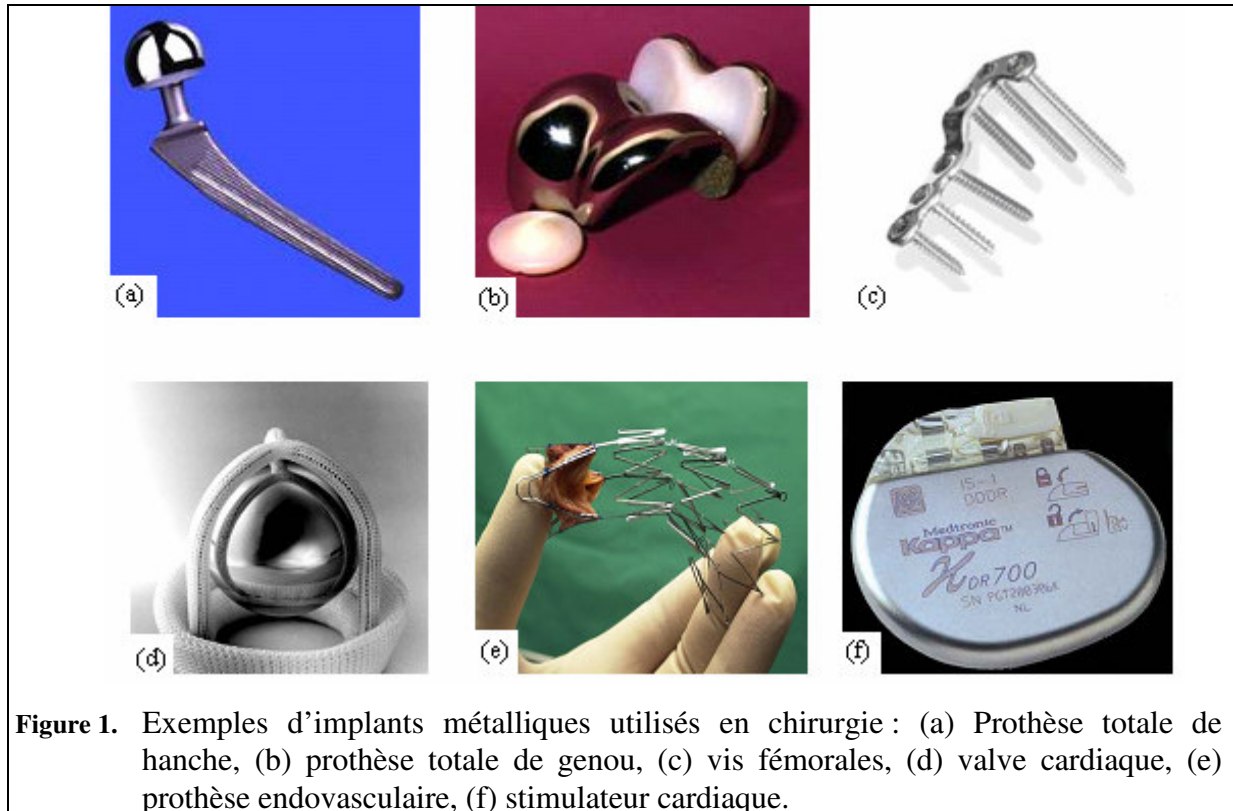


Figure 1. Exemples d'implants métalliques utilisés en chirurgie : (a) Prothèse totale de hanche, (b) prothèse totale de genou, (c) vis fémorales, (d) valve cardiaque, (e) prothèse endovasculaire, (f) stimulateur cardiaque.

Tableau 1. Composition (en % massique) des alliages utilisés comme implants chirurgicaux (D'après (Dee *et al.*, 2003))

Elément	Acier inoxydable 316L	Co-Cr-Mo	Grade 4 Ti	Ti-6Al-4V
Al	-	-	-	5.5-6.5
C	0.03 max	0.35 max	0.01 max	0.08 max
Co	-	Principal	-	-
Cr	17	26-30	-	-
Fe	Principal	0.75 max	0.3-0.5	0.25 max
H	-	-	0.0125-0.015	0.0125 max
Mo	2	5-7	-	-
Mn	2 max	1 max	-	-
N	-	0.25 max	0.03-0.05	0.05 max
Ni	10	1max	-	-
O	-	-	0.18-0.4	0.13 max
P	0.03 max	-	-	-
S	0.03 max	-	-	-
Si	0.75 max	1 max	-	-
Ti	-	-	Principal	Principal
V	-	-	-	3.5-4.5
W	-	-	-	-

(a) Les aciers inoxydables

L'acier inoxydable le plus utilisé dans les applications biomédicales est le grade 316L. Cet alliage est essentiellement composé de fer, de carbone, de chrome, de nickel et de molybdène (Fe, <0.03% C, 16-18.5% Cr, 10-14% Ni, 2-3% Mo, <2% Mn, <1% Si, <0.045% P, <0.03% S) (Tableau 1). Cet alliage est utilisé depuis de nombreuses années pour des applications orthopédiques, notamment dans les tiges fémorales de prothèses de hanche, et ce grâce à ses propriétés mécaniques (Tableau 2) et son faible coût de production (comparativement aux autres alliages) (Yang *et al.*, 2007).

Cependant cet alliage présente une résistance à la corrosion faible lorsqu'il est en contact avec un milieu physiologique. En effet, en raison de la concentration élevée d'électrolytes et de la température ambiante (37°C), les fluides physiologiques du corps humain peuvent être considérés comme un environnement sévèrement corrosif. Il est donc possible de voir apparaître des corrosions localisées, tels que des piqûres ou des crevasses, à la surface d'acier inoxydable. Les ions métalliques présents dans cet alliage, tels que le fer, le chrome et particulièrement le nickel peuvent donc être libérés et entraîner ainsi une toxicité et donc détériorer la biocompatibilité de ce matériau (Leitao *et al.*, 1997). De plus cet alliage présente un module d'Young nettement supérieur à celui de l'os cortical ($E_{316L} = 190 \text{ GPa}$; $E_{\text{os cortical}} =$

15-30 GPa) (Tableau 2), il en résulte donc un mauvais transfert des contraintes pouvant entraîner à terme une résorption osseuse voire un descellement de la prothèse.

Tableau 2. Comparatif des principales propriétés mécaniques des alliages métalliques chirurgicaux et de l'os cortical (D'après (Brunski, 1996))

Matériau	Module d'Young, E (GPa)	Limite d'élasticité (MPa)	Résistance à la traction (MPa)
Acier 316L	190	221-1213	586-1351
Alliage Co-Cr	210-253	448-1606	655-1896
Titane	110	485	760
Ti-6Al-4V	116	896-1034	965-1103
Os cortical	15-30	30-70	70-150

(b) Les alliages Chrome-Cobalt

Les alliages Chrome-Cobalt ont fait leur apparition dans le domaine orthodontique. Cependant ils ont, dès les années 60, été utilisés dans les prothèses articulaires et ce grâce à leur module d'élasticité élevé (210-253 GPa) (Tableau 2), leur dureté et leur bonne résistance à la corrosion (en particulier dans le cas de l'alliage Cr-Co-Mo) (Hanawa, 2002).

(c) Les alliages de titane

Le titane a été découvert en 1790, le minerai était utilisé dans le but d'obtenir de la peinture blanche. Ce n'est qu'en 1940 que des spécialistes américains de l'aéronautique se sont intéressés non plus seulement aux dérivés du titane, mais au métal lui-même. Depuis une trentaine d'années l'alliage de titane Ti-6Al-4V est largement utilisé pour des applications biomédicales, notamment dans la conception des tiges fémorales de prothèses de hanche (Head *et al.*, 1995). Cet alliage présente une excellente biocompatibilité et un module d'Young (116 GPa) inférieur à ceux des aciers inoxydables ou des alliages Cr-Co-Mo (Tableau 2). Cependant ce module d'élasticité reste relativement élevé comparativement à celui de l'os cortical (Ho *et al.*, 1999), et ce à cause d'une fraction volumique de la phase α très élevée. De plus des études ont prouvé que la présence de vanadium et d'aluminium pouvait, à long terme, causer des problèmes de santé (Long et Rack, 1998).

C'est la raison pour laquelle depuis le début des années 1990, de nombreuses équipes de recherche tentent d'élaborer de nouveaux alliages présentant des propriétés mécaniques proches de celles de l'os. La majorité des recherches se sont alors tournées vers l'élaboration d'alliages β . Deux alliages ont ainsi été développés et sont actuellement implantés, le Ti-Mo

(Allvac[®]) et le Ti-12Mo-6Zr-2Fe (TMZF[®]) présentant respectivement des modules d'Young de 78GPa et de 80GPa (Nag *et al.*, 2007).

De plus, afin d'améliorer leur biointégration, les métaux peuvent être recouverts d'hydroxyapatite. Ces dépôts se font par une technique de projection par torche à plasma (Massaro *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004), par dépôt électrolytique ou par la méthode sol-gel.

(3) Les céramiques et les verres

Les céramiques et les verres sont utilisés en tant que matériaux de comblement osseux, pour les prothèses de hanche, les implants dentaires, les implants de l'oreille interne et les valves cardiaques. Cette classe de biomatériaux peut être divisée en deux sous-catégories : les céramiques bioinertes et les céramiques bioactives (Tableau 3).

Tableau 3. Principales céramiques utilisées pour les applications médicales

Céramique	Formule chimique	Type
Alumine	Al ₂ O ₃	Bioinerte
Zircone	ZrO ₂	Bioinerte
Bioverre	Na ₂ OCaOP ₂ O ₃ -Si	Bioactive
Hydroxyapatite	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Bioactive
Phosphate tricalcique	Ca ₃ (PO ₄) ₂	Bioactive + biorésorbable

Tableau 4. Principales propriétés mécaniques des biomatériaux céramique (D'après (Hench, 1996))

Céramique	Module d'Young (GPa)	Résistance à la compression (MPa)	Résistance à la traction (MPa)
Alumine	380	4500	350
Bioverres	22	500	56-83
Phosphates de calcium	40-117	510-896	69-193

(a) Les céramiques bioinertes

Un matériau bioinerte est un matériau doté d'une inertie biologique, chimique, physique et thermique afin de ne pas modifier les fonctions physiologiques normales du corps. La céramique inerte la plus utilisée en tant que biomatériau est l'alumine (Al₂O₃) (Tableau 3). P. Boutin a montré depuis 1972 (Boutin, 1972; Boutin *et al.*, 1988) l'intérêt de l'arthroplastie totale de la hanche par prothèse en alumine frittée. En effet l'alumine présente une inertie chimique, une résistance à la corrosion élevée, une résistance à l'abrasion et aux frottements importantes et une résistance à la compression de 4500 MPa (Tableau 4). Ces propriétés mécaniques en font un matériau de choix pour le revêtement des prothèses de hanche

principalement au niveau des têtes fémorales et du cotyle pour reconstituer l'articulation artificielle.

Plus récemment, Webster *et al.* (Webster *et al.*, 2000) ont mis au point des céramiques d'alumine nanophasiques caractérisées par une microstructure composée de grains de taille réduite. Des modifications ont été apportées sur ces céramiques d'alumine par implantation d'ion Mg^{2+} et NH_3^+ . Les travaux de Zreiqat *et al.* (Zreiqat *et al.*, 1999) ont en effet démontré que l'adhésion et l'étalement de HBDC (Human Bone Derived Cell) sur l'alumine Al_2O_3 . Mg^{2+} était accrue par comparaison avec l'alumine seule.

(b) Les céramiques bioactives et les bioverres

Un matériau bioactif est un matériau capable de créer de fortes interactions avec des tissus vivants. Il existe essentiellement deux catégories de céramiques bioactives : les céramiques phosphocalciques et les bioverres (Tableau 3).

1- Les céramiques bioactives

Les céramiques phosphocalciques sont utilisées dans l'industrie biomédicale principalement pour leur biocompatibilité, leur faible densité, leur stabilité chimique, leur résistance à l'usure élevée et pour leur similitude compositionnelle avec la phase minérale de l'os (Kalita *et al.*, 2007). L'intérêt croissant pour les céramiques phosphocalciques s'explique par la possibilité de synthétiser une céramique macroporeuse dont la taille des pores est adaptée à la colonisation cellulaire. Les deux céramiques bioactives les plus utilisées sont à base de phosphate de calcium : ce sont l'hydroxyapatite (HAP) et le phosphate tricalcique β (TCP).

Cependant, l'hydroxyapatite résiste mal à l'abrasion et au frottement de même que l'instabilité chimique et la présence d'impuretés peuvent altérer ses propriétés mécaniques. Ces céramiques sont également très sensibles aux conditions de l'environnement physiologique en raison notamment des phosphates tricalciques qui, au contact des liquides biologiques, se dissolvent et entraînent des relargages ioniques (Fu *et al.*, 2000).

Face à ces inconvénients, des études se sont portées sur la combinaison de plusieurs types d'hydroxyapatite afin de palier aux problèmes rencontrés. De ce fait, le mélange de HAP, stable dans les fluides biologiques, et de la TCP, biorésorbable, permet de moduler la stabilité et donc de contrôler la bioactivité des substituts (Koch *et al.*, 2007).

A l'heure actuelle, les principales recherches concernant les matériaux céramiques sont axées autour de l'élaboration de céramiques injectables. En effet, de tels matériaux permettraient un comblement des défauts osseux en assurant une reconstruction osseuse localisée mais pourraient également servir de structure échafaudage pour l'ingénierie tissulaire (Gauthier *et al.*, 2005; Laschke *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006).

2- Les verres bioactifs

Un verre est dit bioactif lorsque immergé dans le fluide physiologique, il développe à sa surface une couche d'hydroxyapatite cristallisée carbonatée (Kim *et al.*, 1992). Cette couche est, par sa composition en calcium et phosphore, similaire à la phase minérale de l'os. Elle permet ainsi au matériau d'être utilisée comme implant osseux dans un organisme humain. Le premier verre bioactif a été mis au point par L.L. Hench en 1969. Il s'agit d'un verre composé de SiO₂, CaO, Na₂O et P₂O₅, appelé le « 45S5 de L.L. Hench » (Ogino *et al.*, 1980). Actuellement, ce verre est utilisé en chirurgie réparatrice dans de nombreuses parties du corps humain dont les osselets de l'oreille, les dents, les genoux, les hanches. La résistance à la compression des bioverres est d'environ 500 MPa (Tableau 4) ce qui leur permet de supporter de fortes contraintes mécaniques.

(4) Les matériaux polymères

Les matériaux polymères sont de loin les plus utilisés dans les applications biomédicales. Ils sont essentiellement sollicités pour les implants cardiovasculaires et le remplacement de certains tissus. Ils sont aussi utilisés pour les systèmes de délivrance de principes actifs, pour le diagnostic médical mais également comme matériau support dans l'ingénierie tissulaire. Le tableau 5 liste les principaux polymères utilisés dans le domaine biomédical.

Tableau 5. Applications biomédicales de quelques polymères (D'après (Dee *et al.*, 2003))

Applications	Polymères
Implants cardiovasculaires	Polyéthylène téréphtalate (PET), Polytétrafluoroéthylène expansé (PTFEe)
Implants orthopédiques	Polyéthylène à ultra haut poids moléculaire (UHMWPE), Polyméthacrylate de méthyle (PMMA)

Tableau 6. Principales propriétés mécaniques de biomatériaux polymères (D'après (Kohn et Langer, 1996))

Polymère	Module d'Young (GPa)	Résistance à la traction (MPa)	% d'élongation
Polyméthacrylate de méthyle (PMMA)	2.2	30	1.4
Polyéthylène téréphtalate (PET)	2.14	53	300
Polytétrafluoroéthylène (PTFE)	0.5	17-28	120-350
Polyéthylène à ultra haut poids moléculaire (UHMWPE)	4-12	35	300

Comparativement aux métaux et aux céramiques, les polymères ne possèdent pas un module d'Young et une résistance au frottement élevés (Tableau 6). Pour cette raison, le Polyéthylène à ultra haut poids moléculaire (UHMWPE) et le Polyméthacrylate de méthyle (PMMA) sont les rares polymères à être utilisés en chirurgie orthopédique. En effet le UHMWPE, qui présente un module d'Young de 12 GPa, est utilisé (Brockett *et al.*, 2006) en tant que composant de la cupule cotyloïdienne cimentée opposée à la prothèse fémorale. Cependant, à long terme, ce polymère se dégrade et les débris peuvent engendrer une inflammation des tissus environnants ainsi qu'un descellement de la prothèse (Baudriller *et al.*, 2007; Otto *et al.*, 2006). De récentes études tentent de minimiser cette formation de particules en créant un UHMWPE réticulé (Dumbleton *et al.*, 2006). Le PMMA est utilisé en chirurgie orthopédique pour la fixation des prothèses. Grâce à l'ajout d'un activateur de polymérisation, la diméthylparatoluidine (DMPT), le temps de prise d'un ciment orthopédique est d'environ 15 minutes. Néanmoins, le vieillissement du PMMA peut réduire la durée de vie de la prothèse, c'est la raison pour laquelle des équipes de scientifiques cherchent à améliorer ces propriétés mécaniques en y ajoutant des fibres de titane (Kotha *et al.*, 2006).

Parallèlement à ces études de nombreux chercheurs ont axé leurs recherches sur l'utilisation de matériaux naturels, tels que l'alginate ou le chitosan, comme biomatériaux. En effet, ces matériaux sont parfaitement biocompatibles et biodégradables et représentent donc des structures potentielles pour la repousse cellulaire (Marsich *et al.*, 2007; Yilmaz, 2004).

(a) Le polyéthylène téréphtalate

Le polyéthylène téréphtalate a été breveté en 1941 par deux chimistes britanniques de Manchester, John Rex Whinfield et James Tennant Dickson. Ces chimistes ont également

participé à l'invention du Térylène® en 1941, marque de fibre textile du groupe ICI (Imperial Chemical Industry), dont les brevets furent rachetés en 1945 par le groupe américain Dupont de Nemours. Ce dernier créa ensuite le Dacron® (1950) et le Mylar® (1952).

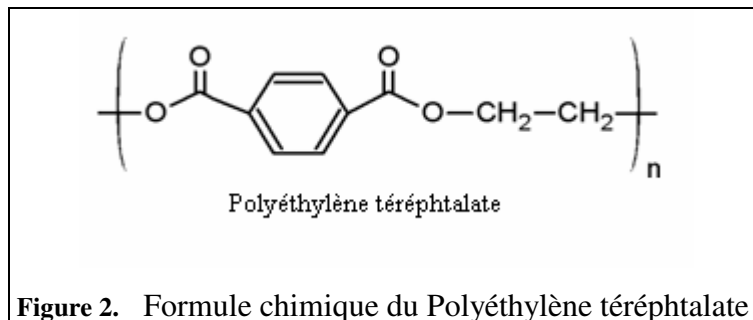


Figure 2. Formule chimique du Polyéthylène téréphtalate

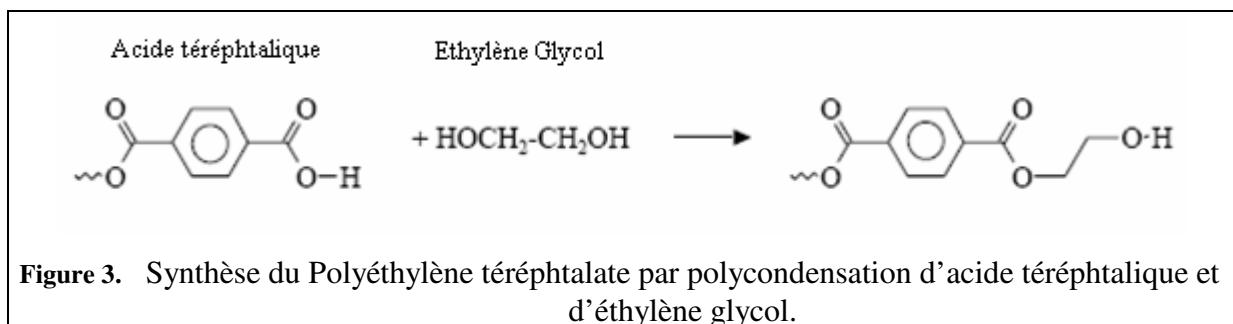


Figure 3. Synthèse du Polyéthylène téréphtalate par polycondensation d'acide téréphtalique et d'éthylène glycol.

Ce polymère (Figure 2), obtenu par la polycondensation de l'acide téréphtalique et de l'éthylène glycol (Figure 3), est à l'heure actuelle un des matériaux les plus utilisés dans le domaine vasculaire. Il se présente généralement sous la forme de fils composés de plusieurs filaments ayant une résistance à la traction élevée (Tableau 6). Ces fils peuvent alors être tissés ou tricotés en fonction des propriétés demandées. En effet, les prothèses tissées donnent lieu à une faible porosité et à un fluage minimum alors que les prothèses tricotées présentent une porosité plus importante. Le but de ces différentes techniques de mise en forme est d'améliorer la biocompatibilité du matériel et d'obtenir des propriétés qui se rapprochent le plus possible du vaisseau naturel. La mise en forme du polymère essaie de recréer les effets de l'élastine et du collagène pour reproduire les propriétés mécaniques natives et pour reconstituer la fonction mécanique native.

A l'heure actuelle le Dacron® et le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) sont couramment utilisés pour le remplacement de vaisseaux de gros diamètres (Wong *et al.*, 2006), ceci s'explique par leur propriété d'élongation élevée (%_{élongation} PET= 300, %_{élongation} ePTFE= 120-350 ; cf. Tableau 6). Le taux de réussite dans le cas de greffes de bifurcation aortique est de 93%, cependant ce taux diminue considérablement lorsqu'il s'agit de vaisseaux de diamètre inférieur à 6mm, ceci étant dû aux phénomènes de thrombose. De plus, le PET

n'étant pas un polymère parfaitement inerte, il peut par conséquent subir des attaques chimiques ou des hydrolyses lors de l'implantation ce qui peut conduire à une rupture de la prothèse.

Afin de limiter les risques de thrombose, de nombreuses équipes de recherches tentent de modifier sa surface dans le but de limiter tout besoin de ré-intervention chez le patient.

Une des solutions envisageables serait d'endothélialiser la prothèse de PET avant l'implantation. En effet des études ont montré, sur des animaux, que l'ensemencement de cellules endothéliales à la surface de PET et de ePTFE rendait les surfaces thromborésistantes comparativement aux implant nus (Bordenave *et al.*, 2005; Boyd *et al.*, 1988; Douville *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1991). Ces études seront détaillées dans le chapitre concernant le développement de l'ingénierie tissulaire (Chapitre I.C : « L'ingénierie tissulaire »).

Quelque soit la méthode choisie, il existe à l'heure actuelle de nombreuses recherches qui tentent d'améliorer la surface du PET afin d'améliorer sa biocompatibilité.

(5) Choix d'un matériau pour une application médicale

A l'heure actuelle chaque pathologie nécessitant l'utilisation de biomatériaux s'accompagne d'un cahier des charges spécifique. Les matériaux sont donc choisis de manière à y répondre parfaitement.

Par exemple, les matériaux constitutifs de la partie articulaire d'une prothèse totale de la hanche doivent permettre le mouvement de l'articulation sans frottement excessif, tout en produisant une quantité minimale de débris d'usure pendant la durée de vie de la prothèse (Ge *et al.*, 2003). De plus les débris d'usure produits ne doivent pas provoquer de réaction inflammatoire locale ou générale, ni déclencher de réaction immunitaire spécifique telle que des allergies. La partie métallique de la prothèse en contact avec l'os ne doit pas relâcher de produits de corrosion toxiques pour les cellules osseuses cependant elle doit idéalement favoriser la recolonisation par le tissu osseux en contact intime avec la prothèse (MacDonald *et al.*, 2004). Le cahier des charges reste spécifique à chaque application. En effet, une sonde urinaire ne doit pas faciliter la pénétration ou le développement de bactéries dans le tractus urinaire et dans la vessie alors qu'un vaisseau sanguin artificiel ne doit pas favoriser la condensation de plaquettes et la formation d'un caillot sur la surface qu'il expose au flux sanguin (Spijker *et al.*, 2002). D'autres propriétés viennent s'ajouter à ce cahier des charges, telles que la conductivité électrique et thermique (stimulateurs cardiaques) ou la transmission de la lumière (lentilles intraoculaires).

Un autre paramètre primordial dans le choix d'un biomatériau est son comportement au cours de la stérilisation. En effet tout matériel médical se doit d'être exempt de bactéries lors de son utilisation. Les méthodes de stérilisation couramment utilisées sont le traitement par autoclave (conditions humides, haute température et haute pression), les rayonnements gamma, le formaldéhyde et l'oxyde d'éthylène. Cependant de tels procédés peuvent induire des modifications des propriétés des matériaux, par exemple les rayonnements gamma peuvent induire une dégradation et une réticulation des polymères et transformer inévitablement leurs propriétés mécaniques voire influencer leur biocompatibilité (libération de particules, molécules pouvant être toxiques). Toutes ces conditions sont donc bien entendu à prendre en compte avant la mise sur le marché d'un nouveau biomatériau.

(6) Quels sont les problèmes liés à l'implantation des biomatériaux ?

Les matériaux de substitution osseuse ou vasculaire actuellement utilisés en clinique présentent un potentiel de réussite à long terme aléatoire principalement en raison du déficit de biointégration au sein des tissus receveurs (Hubbell, 1999; Sakiyama-Elbert et Hubbell, 2001). Leur durée de vie est en effet presque toujours inférieure à la durée de vie du patient. Le principal problème vient du fait que les interactions entre la surface du biomatériau et les cellules peuvent induire de nombreuses réactions, inflammatoires, immunitaires ou infectieuses allant même jusqu'à entraîner une encapsulation de l'implant (dans le cas d'implants osseux) ou une thrombose (dans le cas d'implants vasculaires). De plus, la qualité de vie du patient est souvent diminuée par la prise permanente d'antiagrégants plaquettaires et par le besoin de subir plus d'une opération en raison du problème de durée de vie exposé ci-dessus. Tous ces problèmes sont intimement liés à l'adsorption de protéines intervenant dès l'implantation du biomatériau dans les fluides biologiques. En effet lorsqu'un matériau synthétique est implanté dans un environnement physiologique on assiste à la formation d'une couche de protéines d'environ 50Å d'épaisseur, et ce en moins de 5 secondes. Une fois qu'elles sont adsorbées sur la surface de l'implant, les protéines vont interagir avec le substrat par le biais de forces intramoléculaires telles que les liaisons ioniques, les interactions hydrophobes ou les interactions par transfert de charge. Cette adsorption de protéines a de nombreuses conséquences sur le devenir des implants. En effet, elle agit sur la coagulation sanguine, l'activation du complément, l'adhésion bactérienne et cellulaire. Cette diversité suggère donc que tous les processus biologiques initiés aux interfaces matériau/tissu seront

grandement affectés par l'adsorption des protéines. La formation de thrombus (Figure 4) et les réactions inflammatoires (Figure 5) sont des conséquences directes de l'adsorption de protéines. Depuis plusieurs années de nombreux chercheurs tentent donc de modifier la surface des biomatériaux afin de contrôler l'adsorption de protéines en fonction d'une application choisie. On cherchera, par exemple, à limiter voire inhiber l'adsorption de fibrinogène responsable de la formation de thrombus dans le cas de matériaux de substitution vasculaire. Au contraire, une adsorption homogène de collagène I favorisera l'adhésion des ostéoblastes lors de l'implantation de matériaux de comblement osseux.

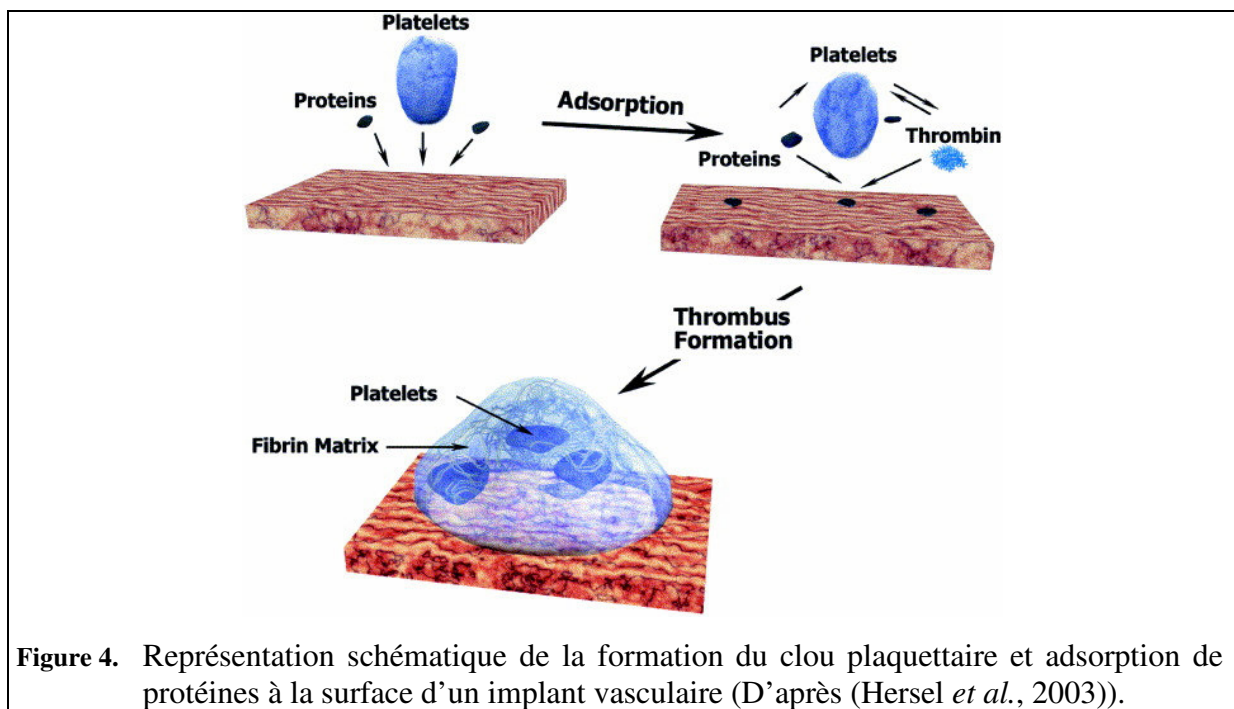
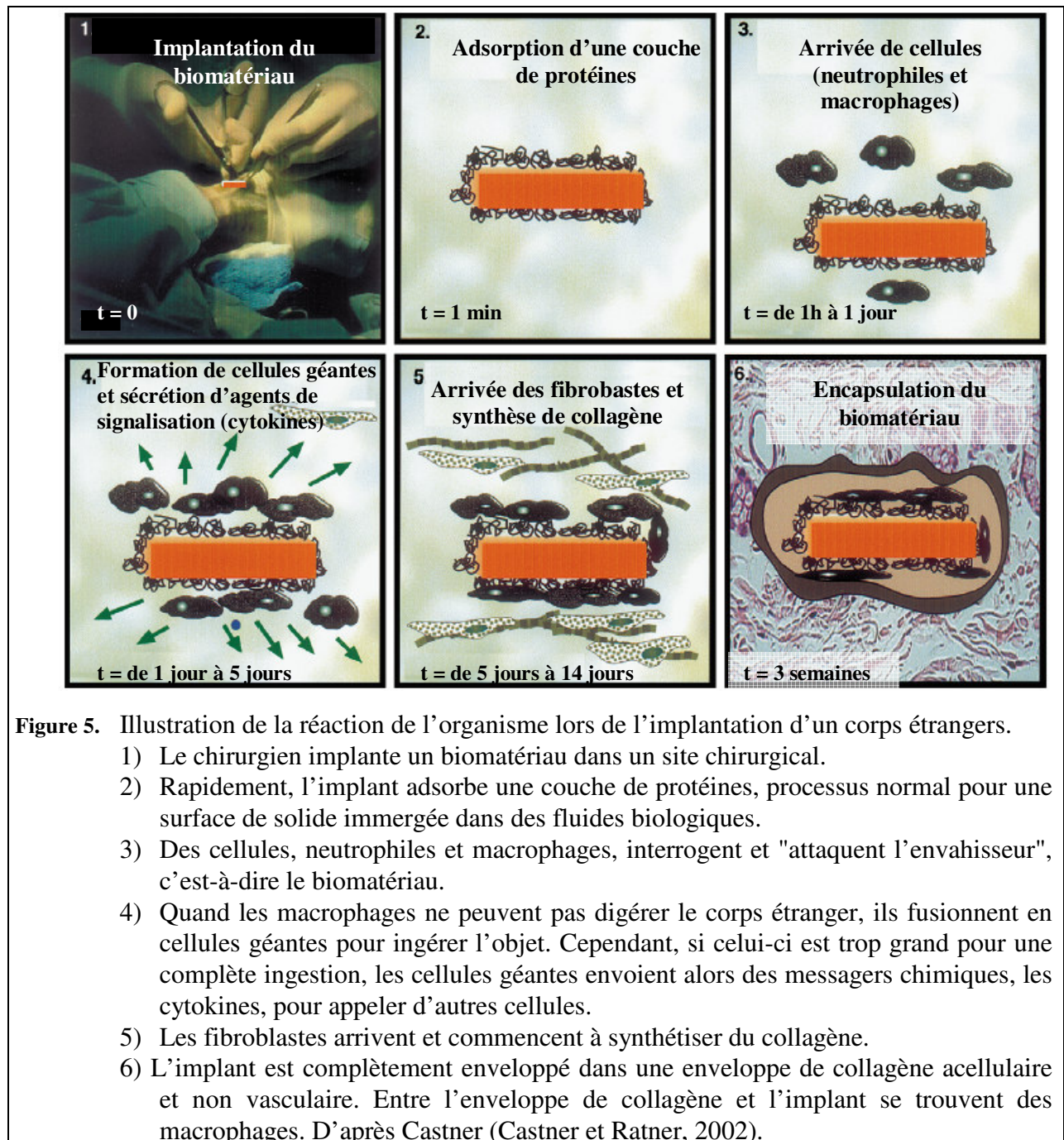


Figure 4. Représentation schématique de la formation du clou plaquettaire et adsorption de protéines à la surface d'un implant vasculaire (D'après (Hersel *et al.*, 2003)).



C) L'ingénierie tissulaire

(1) Généralités

Les domaines des biomatériaux, d'une part, et de la transplantation d'organes, d'autre part, connaissent une période de croissance et de popularité, notamment en raison de l'augmentation de l'espérance de vie, du vieillissement de la population et de la volonté collective d'améliorer la qualité de vie des patients. Par contre, ces deux approches, destinées

à pallier aux défaillances des organes, ne sont pas infaillibles. Les problèmes relatifs à ces deux techniques ont été présentés dans les chapitres précédents.

Face à ces problèmes, les trente dernières années ont été marquées par l'émergence d'une nouvelle spécialité pluridisciplinaire, à l'interface entre les sciences du vivant et les sciences de l'ingénieur: il s'agit de l'ingénierie tissulaire. Le but principal de cette nouvelle discipline est la reconstruction tant des tissus que des organes humains. Il existe à ce jour plusieurs approches pour reproduire des tissus biologiquement actifs : (i) la thérapie cellulaire, (ii) la reconstruction de tissus *in vitro* et (iii) l'implantation de matériaux hybrides cellularisés.

Le but de ce chapitre est de présenter brièvement les principales techniques d'ingénierie tissulaire par le biais d'exemples faisant l'objet de la recherche internationale actuelle. Une attention particulière sera portée au concept de matériau hybride.

(2) *La thérapie cellulaire*

La thérapie cellulaire est une technique très développée ces dernières années pour le traitement de maladies telles que le diabète, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer ou les maladies cardiovasculaires. Cette approche permet d'ensemencer des cellules dans le corps humain, sous forme encapsulée ou non, ou dans un site isolé du système immunitaire. Cette technique permet alors de corriger un déficit sécrétoire, hormonal ou autre.

Depuis le début des années 80, les chercheurs tentent d'utiliser la thérapie cellulaire pour le traitement du diabète. En effet, l'implantation d'îlots de Langerhans permet de libérer l'insuline de façon contrôlée en fonction de la glycémie. Cependant les premiers essais n'ont présenté que de faibles taux de réussite, essentiellement à cause de la toxicité des immunosuppresseurs prescrits pour éviter les réactions de rejet. En 2001, Shapiro *et al.* a mis au point un nouveau cocktail d'immunosuppresseurs, appelé le protocole d'Edmonton, capable de préserver les propriétés des îlots de Langerhans. Au cours de leur étude clinique, 16 patients atteints de diabète de type 1 ont reçu une greffe d'îlots de Langerhans associée au protocole d'Edmonton. Un mois après l'implantation, tous les patients présentaient une indépendance totale à l'insuline. Le taux de réussite à 1 an était de 80% comparativement à 14% lors de l'administration d'immunosuppresseurs classiques (Ryan *et al.*, 2001; Shapiro *et al.*, 2001). A l'heure actuelle, les chercheurs tentent de mettre au point une technique qui permettrait de réduire voire de supprimer la prise d'immunosuppresseurs. Une voie de recherche est l'utilisation de l'immunoisolement comme mesure de protection des îlots implantés contre le système immunitaire du receveur. En effet, l'immunoisolement des îlots

par leur encapsulation dans une membrane artificielle protectrice, perméable au glucose et à l'insuline mais imperméable aux facteurs intervenant dans le rejet représente une solution très prometteuse dans le traitement du diabète. Quelques équipes de chercheurs à travers le monde ont effectué des transplantations d'îlots microencapsulés et ont réussi à normaliser les niveaux de la glycémie de certains animaux diabétiques. Ces différents travaux ont permis à des souris, des rats, des chiens et même des singes de retrouver une vie plus normale pour une période de temps plus ou moins longue (Dufrane *et al.*, 2006; Elliott *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2005; Tashiro *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). En 2006, l'équipe de Calafiore *et al.* a reporté le cas des deux premiers patients diabétiques de type 1 ayant reçu une greffe d'îlots micro-encapsulés (Calafiore *et al.*, 2006). Bien que ce traitement n'ait pas éliminé la nécessité de l'insulinothérapie, ils ont amélioré considérablement le contrôle glycémique avec seulement 1/3 de la dose d'insuline antérieure.

De la même manière, la maladie de Parkinson a été traitée par des greffes allogéniques ou xénogéniques de neurones fœtaux permettant de corriger le déficit en dopamine caractéristique de cette maladie, sans nécessité d'encapsulation puisque le système nerveux central est quasiment dépourvu de mécanisme de rejet (Tan, 2001; Taylor et Minger, 2005).

(3) *La reconstruction tissulaire in vitro*

Il existe différentes stratégies pour faire croître les tissus de façon contrôlée. La première est basée sur la capacité qu'ont les cellules, lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions adéquates, à s'auto-assembler en un tissu cohérent tout en s'entourant de leur propre matrice extracellulaire. La deuxième utilise un biomatériau biodégradable comme structure de guidage lors de la reconstruction tissulaire. A l'heure actuelle, la reconstruction tissulaire *in vitro* est utilisée pour la réparation du cartilage (Mesa *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Schulz et Bader, 2007; Vinatier *et al.*, 2006), de la cornée (Germain *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2005; Vasil'ev *et al.*, 2005) et même des vaisseaux sanguins (Auger, 2000; L'Heureux *et al.*, 2001).

En effet, depuis plusieurs années Auger *et al.* développent, au sein du Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale à Québec, un vaisseau sanguin entièrement reconstitué à partir de cellules humaines (Laflamme *et al.*, 2006; Stoclet *et al.*, 2004). Leur substitut est constitué de feuillets produits à partir de cellules musculaires lisses (CML) ainsi que de fibroblastes qui sécrètent une matrice extracellulaire abondante grâce à un milieu enrichi en acide ascorbique. Le feuillet de CML (média) est enroulé autour d'une tige (pipette) qui donne non seulement la forme tubulaire désirée, mais permet aussi de préserver une lumière centrale. Après quelques

semaines de maturation, la seconde couche (adventice), composée de fibroblastes et de collagène, est enroulée autour de la média. Enfin, après un temps de maturation additionnel, ces substituts vasculaires sont endothélialisés par simple ensemencement de cellules endothéliales dans leur lumière. Un bioréacteur spécifique a permis de mieux contrôler les conditions de culture. Les caractéristiques les plus marquantes de ce vaisseau sanguin reconstruit sont sa capacité de vasoconstriction suite à une stimulation par des agonistes, et surtout sa résistance mécanique à l'éclatement de 2 594 mmHg, comparée aux 1 680 mmHg d'une veine saphène humaine qui est actuellement considérée comme le greffon optimal pour une reconstruction vasculaire des membres inférieurs. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucune étude clinique concernant l'implantation de vaisseaux totalement reconstitués *in vitro*.

Parallèlement, la reconstruction *in vitro* de la peau est certainement le domaine où la bio-ingénierie tissulaire a le plus d'applications cliniques (Auger *et al.*, 2004; Bannasch *et al.*, 2005; Horch *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2007; Hudon *et al.*, 2003; Metcalfe et Ferguson, 2007). Il est en effet possible aujourd'hui de reconstruire *in vitro* les deux couches de la peau : le derme et l'épiderme (Braye *et al.*, 2005). La reconstruction de l'épiderme a été initiée aux Etats Unis en 1975 par Rheinwald et Green (Rheinwald et Green, 1975). La technique consiste à cultiver *in vitro*, après biopsie de seulement quelques cm² de peau du malade, les kératinocytes basaux isolés par séparation mécanique et enzymatique. Grâce à l'utilisation d'une couche nourricière de fibroblastes de souris (préalablement irradiés pour éviter leur prolifération), de l'apport d'hydrocortisone pour maintenir un aspect stratifié des colonies, et d'un facteur de croissance épidermique qui accélère la multiplication des cellules en ralentissant leur vieillissement, on obtient, en 3 semaines, avec un facteur de multiplication de 1 pour 10 000 un feuillet épithélial multicouche. Ce feuillet présente les caractéristiques de l'épiderme naturel avec des cellules basales profondes et des kératinocytes en voie de différenciation dans les couches supérieures. En 3 semaines il est ainsi possible, à partir d'une biopsie de 1 à 5 cm², de recouvrir, avec le feuillet épidermique cultivé *in vitro*, la surface cutanée d'un adulte (17 000 cm² environ). Ces feuillets épidermiques sont actuellement commercialisés sous le nom d'Epicel[®] (MacNeil, 2007).

Dans le cadre de la reconstruction de l'épiderme il existe deux substrats dermiques différents : (i) les substrats dermiques acellulaires destinés à guider la reconstruction du derme *in vivo* (Integra[®]), et (ii) les substrats dermiques vivants qui contiennent des fibroblastes cultivés sécrétant les facteurs de croissance qui peuvent manquer au niveau des plaies (Dermagraft[®]). L'association des techniques de reconstruction de l'épiderme et du derme a

aujourd'hui conduit à la réalisation de peaux totales reconstruites. Les principaux produits sur le marché à l'heure actuelle sont Apligraf[®], Orcel[®] et Permaderm[®].

(4) Concept des matériaux hybrides

Les matériaux de substitution osseuse ou vasculaire actuellement utilisés en clinique présentent un potentiel de réussite à long terme aléatoire principalement en raison du déficit de biointégration au sein des tissus receveurs (Hubbell, 1999; Sakiyama-Elbert et Hubbell, 2001). Sur les plans fondamental et expérimental, l'élaboration d'organes artificiels hybrides associant une composante cellulaire ou tissulaire et une composante artificielle matricielle d'origine naturelle ou synthétique, permet d'améliorer les propriétés de biointégration de ces substituts. L'idéal serait que ce matériau hybride soit capable d'assurer de façon transitoire la fonction du tissu qu'il remplace, en induisant la régénération du tissu et en assumant son rôle physiologique.

(a) Chirurgie orthopédique

En chirurgie osseuse, l'un des problèmes majeurs à résoudre est de disposer d'un biomatériau avec des caractéristiques biomécaniques optimales. En cas de pertes osseuses importantes (traumatismes ou pathologies tumorales), l'implantation de blocs volumineux de biomatériaux pose le problème de leur réhabilitation osseuse. On peut alors associer à ces matériaux une composante cellulaire qui conduit ainsi au concept d'os hybride ou de substitut osseux vivant. Les matériaux peuvent être rendus biologiquement actifs par fonctionnalisation de leur surface avec notamment des peptides capables de recruter des cellules intervenant dans la réparation du tissu, que le recrutement ait lieu *in vitro*, préalablement à l'implantation dans les tissus lésés, ou *in vivo*. La composante cellulaire a pour but de synthétiser le plus rapidement un tissu ostéoïde. La source optimale de cellules est constituée par des Cellules Stromales de la Moelle Osseuse (CSMO) qui ont de grandes capacités de prolifération et un pouvoir ostéogène élevé (Cancedda *et al.*, 2003; Pelled *et al.*, 2002). En effet, la reconstruction du tissu osseux par l'implantation de CSMO chez le petit animal a été démontrée dès 1966 par Friedenstein *et al.* (Friedenstein *et al.*, 1966).

Depuis cette découverte de nombreux chercheurs ont focalisé leurs travaux sur la réalisation de matériaux hybrides combinant des structures 3D minéralisées et des CSMO (Kneser *et al.*, 2006). De nombreux résultats ont alors été obtenus concernant la réparation de défauts osseux chez le petit (Ohgushi *et al.*, 1989; Schieker *et al.*, 2004) et le gros animal

(Bruder *et al.*, 1998; Kon *et al.*, 2000; Petite *et al.*, 2000). Par exemple, Petite *et al.* ont chargé des CSMO sur des structures coralliennes avant de les implanter dans des tibias de mouton (Petite *et al.*, 2000). La fusion entre le biomatériau et l'os a pu être observé dans 3 cas sur 7. Dans le cas du corail implanté seul, aucune fusion n'a été observée. Ces résultats confirment ceux de Bruder *et al.* obtenus lors de l'implantation de cellules autologues ensemençées sur de l'hydroxyapatite dans le fémur de chiens adultes (Bruder *et al.*, 1998). Compte tenu des résultats obtenus lors d'utilisations chez l'animal, la recherche actuelle vise à implanter ces matériaux hybrides chez l'homme. Le premier essai clinique a été réalisé en 2001 par Quarto *et al.* (Quarto *et al.*, 2001). Lors de cette étude, ils avaient choisi d'implanter des structures d'hydroxyapatite poreuse chargée par des CSMO autologues sur un groupe de 4 patients. Après l'opération, aucune réaction inflammatoire n'a été détectée au niveau de l'implant. Après 6 mois les radiographies montraient une parfaite fusion entre le tissu receveur et l'implant comparativement au matériau implanté acellularisé. Récemment, cette équipe a réalisé une étude de suivi à 7 ans sur 3 des patients (Marcacci *et al.*, 2007) et a ainsi démontré que les implants étaient toujours parfaitement intégrés et qu'il n'existait aucune fracture au niveau des implants. Par cette étude, ils ont mis en évidence l'intérêt de tels matériaux hybrides pour la reconstruction des tissus osseux. D'autres essais cliniques sont actuellement en cours et les premiers résultats semblent confirmer l'étude de Quarto. Morishita *et al.* (Morishita *et al.*, 2006) ont mis au point une approche permettant de combler les défauts provoqués par l'ablation de tumeurs osseuses. Ils associent des cellules souches mésenchymateuses différenciées en ostéoblastes, issues de la moelle osseuse du patient, sur de l'hydroxyapatite afin de réaliser un matériau de comblement osseux. Les résultats déjà obtenus statuent sur le pouvoir ostéogène de ces céramiques hybrides. Un autre type de matériau associant des cellules ostéoblastiques et une matrice osseuse déminéralisée est développé par Pradel *et al.* (Pradel *et al.*, 2006) afin de combler les défauts osseux liés à l'ablation de kystes mandibulaires. Lors de leur étude clinique les défauts de 11 patients ont été comblés par le biomatériau hybride et 11 autres par de l'os spongieux issu de la crête iliaque. Après 3 et 6 mois aucune différence n'était visible entre les 2 groupes de patients. Cependant, les radiographies à 1 an montrent que l'ossification est bien plus élevée dans le cas du traitement par les matériaux hybrides. Ce résultat devra être validé dans quelques années afin d'évaluer la stabilité à long terme de ce type d'implants. Cependant tous ces résultats semblent indiquer que l'élaboration de matériaux hybrides est une voie très prometteuse pour le comblement des défauts osseux.

(b) Chirurgie vasculaire

En chirurgie vasculaire, pour contrôler la thrombogénèse, un substitut vasculaire doit avoir une paroi interne proche de la paroi vasculaire naturelle recouverte de cellules endothéliales. Une stratégie consiste à recouvrir la surface endoluminale d'une prothèse artérielle synthétique, préalablement à son implantation, par un feuillet endothélial (néoendothélium) obtenu à partir d'une culture *in vitro* de cellules endothéliales prélevées chez le receveur (concept de substitut vasculaire bioartificiel).

Il existe deux méthodes pour ensemercer les cellules à la surface du matériau : la procédure en 2 étapes et la procédure en 1 étape. A l'heure actuelle la procédure en 2 étapes est la méthode qui a fourni les meilleurs résultats, elle est donc couramment employée. Dans cette méthode les cellules sont prélevées chez le patient, habituellement au niveau de veines, des artères ou de la graisse sous-cutanée, et sont mises en culture *in vitro* durant plusieurs semaines dans le but d'en augmenter le nombre. La durée moyenne de culture varie généralement entre 2 et 4 semaines (Zilla *et al.*, 1990). Les cellules sont ensuite ensemençées à densité élevée à la surface de l'implant. Des nombreuses études ont été réalisées sur les animaux (Hess *et al.*, 1993; Koveker *et al.*, 1991; Seeger et Klingman, 1988) cependant ces modèles ne peuvent pas être transposés à l'homme car il est rapidement apparu que les animaux avaient, contrairement à l'homme, la capacité d'auto-endothélialiser leur lumière vasculaire (Teebken *et al.*, 2003). Il existe cependant aujourd'hui de nombreuses études cliniques prouvant l'efficacité de ces matériaux pour les pontages coronariens ou périphériques. L'étude la plus importante à ce jour a été menée par Meinhart *et al.* et consistait en l'implantation en position fémoro-poplitée de 153 prothèses de PTFEe endothélialisées chez 136 patients (Meinhart *et al.*, 2001). Au bout de 7 ans le taux de réussite concernant les prothèses de 6 mm de diamètre était de 64,4%. Deutsch *et al.* ont également mené une étude clinique portant sur l'implantation de prothèses de PTFEe endothélialisées chez 100 patients (Deutsch *et al.*, 1999). Après 9 ans, le taux de réussite de ces prothèses hybrides était de 65% alors qu'il n'était que de 16% dans le cas des prothèses classiques. Les résultats obtenus au cours de ces deux études semblent indiquer que les prothèses de PTFEe endothélialisées peuvent dès à présent être utilisées de façon routinière pour la substitution coronarienne (Laube *et al.*, 2000) et périphérique (Deutsch *et al.*, 1997; Meinhart *et al.*, 2001; Zilla *et al.*, 1994).

Cependant cette procédure en 2 étapes présente certains inconvénients. Premièrement le temps de culture nécessaire à la prolifération des cellules autologues du patient nécessite que

l'intervention soit programmée à l'avance, il n'est donc pas possible d'utiliser ce type d'implantation dans le traitement d'une urgence. De plus la culture cellulaire *in vitro* représente un surcoût non négligeable. C'est donc pour palier à ces inconvénients que la procédure en 1 étape a été développée. Cette méthode propose que le prélèvement et l'ensemencement des cellules autologues du patient soient réalisés en per-opératoire. Les premiers résultats cliniques obtenus par cette méthode présentent des taux de réussite nettement inférieurs à ceux obtenus par la procédure en 2 étapes. Par exemple, Herring *et al.* n'ont obtenu un taux de réussite que de 38% 2,5 ans après l'implantation de prothèses de PTFE endothélialisées en position fémoro-poplitée selon la procédure en 1 étape (Herring *et al.*, 1994). Le faible taux de réussite de cette méthode est dû au décollement d'un grand nombre de cellules lorsque la prothèse est exposée au flux sanguin. Un des problèmes à résoudre dans la procédure en 1 étape est donc de faire adhérer le néoendothélium à la composante synthétique. Il est alors nécessaire d'interposer une matrice de nature appropriée qui puisse favoriser l'adhésion et le maintien de cellules endothéliales. Ainsi, l'utilisation de prothèses bioartificielles élaborées selon cette dernière stratégie trouverait un intérêt en chirurgie artérielle de petit calibre pour la substitution coronarienne et périphérique.

Parallèlement à ces travaux, de nombreuses équipes de recherches tentent d'élaborer d'autres matériaux capables de restaurer au mieux les propriétés des vaisseaux sanguins. Une stratégie consiste à associer des cellules à un support polymère dégradable avant l'implantation. Ainsi, les cellules une fois incorporées dans le support polymérique sécrètent des quantités variables de matrice extracellulaire conduisant à la reconstruction d'une structure tissulaire proche du tissu d'origine. Bien que la résistance mécanique de ces tissus soit très élevée, la présence du squelette biodégradable engendre le plus souvent une incompatibilité de compliance entre les cellules et le matériau. A l'heure actuelle, le poly- ϵ -caprolactone (Lee *et al.*, 2003; Ozawa *et al.*, 2002), le polyacide glycolique (Heydarkhan-Hagvall *et al.*, 2006; Shum-Tim *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2001) ainsi que leurs copolymères (Inoguchi *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004) sont les matériaux les plus utilisés dans ce type d'application.

Quelle que soit l'application envisagée (vasculaire ou orthopédie), les matériaux hybrides requièrent une rapide colonisation cellulaire. Il est donc nécessaire d'augmenter leur biocompatibilité par le biais de modifications chimiques, physiques ou biologiques afin de rendre leur surface plus « attractive » pour l'adhésion cellulaire.

II. Quelles sont propriétés physico-chimiques superficielles des matériaux influençant l'adhésion cellulaire?

L'adhésion cellulaire est impliquée dans de nombreux phénomènes biologiques telles que l'embryogenèse, la réparation tissulaire, la cicatrisation, les réponses immunitaires mais également dans l'intégration des biomatériaux lors de leur implantation. En effet la biocompatibilité des biomatériaux est liée au devenir des cellules à leur contact et plus particulièrement à l'adhésion cellulaire sur leur surface. Les caractéristiques de surface des biomatériaux telles que la porosité, la rugosité ou la charge jouent alors un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire. Le chapitre précédent a démontré l'intérêt de matériaux hybrides en chirurgie vasculaire et en chirurgie orthopédique (Chapitre I-C-4 : «Concept des matériaux hybrides»). Cependant la cellularisation de biomatériaux avant leur implantation nécessite une parfaite connaissance des interactions surface-cellules. De manière générale les paramètres de surface intervenant dans l'adhésion cellulaire peuvent être classés en trois parties : les paramètres morphologiques, les paramètres physico-chimiques et les paramètres biologiques.

A) Paramètres morphologiques

Les modifications des paramètres morphologiques sont connues et utilisées pour influencer la réponse des cellules et des tissus sur les implants. Les paragraphes suivants détaillent les trois types de modifications les plus utilisés dans la recherche biomédicale. Il s'agit de la porosité, de la rugosité et de la topographie.

(1) Porosité

La porosité est définie comme étant le pourcentage d'espace vide dans un solide, il s'agit d'une propriété morphologique indépendante du matériau (Leon y Leon, 1998). Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont prouvé l'intérêt d'une microporosité à la surface des matériaux, notamment dans le domaine des implants orthopédiques et dentaires. Les pores sont en effet nécessaires pour la formation osseuse car elles permettent d'une part la migration et la prolifération des ostéoblastes et des cellules mésenchymateuses et d'autre part la vascularisation (Karageorgiou et Kaplan, 2005; Kuboki *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 2006). De plus, une surface poreuse augmente la cohésion entre l'implant et l'os naturel environnant, procurant ainsi une meilleure stabilité mécanique à cette interface (Story *et al.*, 1998; Yoshikawa et Myoui, 2005). En fonction du matériau, plusieurs techniques peuvent être utilisées pour induire des porosités. Dans le cas du développement d'architectures 3D les

méthodes les plus courantes sont : l'expansion gazeuse, la lyophilisation ou l'agglomération (Rosa *et al.*, 2002). Depuis peu, des équipes de chercheurs ont focalisé leurs études sur l'intérêt de la nanoporosité sur l'adhésion cellulaire et la réparation tissulaire. Il existe à ce jour que très peu d'études corrélant la nanoporosité et son influence sur l'interface cellule-matériau et donc sur la biointégration des implants (Faust *et al.*, 2001). Cependant plusieurs théories peuvent être envisagées. Il est possible que les structures nanoporeuses, qui de part leur taille ne permettent pas une croissance cellulaire, puissent être remplies de collagène et de matrice osseuse. Dans ce cas, une surface nanoporeuse pourrait servir de support pour la minéralisation des cellules. Webster *et al.* ont ainsi démontré que les céramiques nanoporeuses favorisaient l'adhésion des ostéoblastes (Webster *et al.*, 1999). Plus récemment, Popat *et al.* ont confirmé ce résultat en étudiant l'adhésion de cellules issues de la moelle osseuse de souris sur des céramiques nanoporeuses (Popat *et al.*, 2007). Après 3 semaines de culture les cellules ensemencées sur les surfaces d'alumine nanoporeuses présentaient une augmentation (i) du taux d'adhésion, de prolifération et de viabilité cellulaire de 45%, (ii) de l'expression de la phosphatase alcaline de 35% et (iii) de la production de matrice extracellulaire de 50% comparativement aux surfaces ne présentant pas de nanoporosité. Il semble donc, de part ces résultats, que la différenciation ostéoblastique des précurseurs issus de la moelle osseuse soit fortement influencée par la nanoporosité de surface des biomatériaux.

La porosité intervient également dans le domaine de la substitution vasculaire. Depuis 1960, de nombreuses études ont en effet démontré que la porosité était essentielle au bon fonctionnement des prothèses synthétiques de petit diamètre (Zhang *et al.*, 2004). Ces recherches ont ainsi statué qu'une porosité interne des substituts vasculaires était nécessaire à l'ancrage du néointima et qu'une porosité externe permettait la colonisation de la prothèse par les tissus périphériques. La présence de porosité permet également une endothélialisation plus rapide en favorisant l'angiogénèse. De nombreuses études se sont depuis portées sur la taille des pores nécessaire à la croissance cellulaire. Par exemple Fujimoto *et al.* ont implanté chez le chien des prothèses de polyuréthane présentant des microporosités allant de 1,71 à 30 μ m de diamètre (Fujimoto *et al.*, 1993). Après 6 mois d'implantation, une endothélialisation complète n'a pu être obtenue que sur les prothèses présentant des pores de 30 μ m de diamètre. Ce résultat a été confirmé il y a quelques années par les travaux de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2004). Cette équipe a réalisé des substituts vasculaires en polyuréthane microporeux présentant une porosité externe variant entre 5 et 30 μ m et une porosité interne de 30 μ m. Ces

prothèses ont été implantées dans l'aorte abdominale de rats pendant une période de 1 à 8 semaines. Bien que tous les implants aient été endothélialisés au bout de 4 semaines, la cellularisation la plus rapide a été observée dans le cas des implants présentant une porosité interne d'au moins 20 μ m.

(2) Rugosité

La rugosité d'un matériau destiné à l'implantation a de l'importance dès lors que sa surface entre en contact avec les tissus environnants, comme par exemple l'os ou les tissus fibreux. En effet, les surfaces présentant des rugosités et des discontinuités vont induire des interactions biologiques spécifiques comparativement à une surface plane (Kasemo et Gold, 1999). Cependant la réponse cellulaire par rapport à une surface rugueuse dépend complètement du type cellulaire étudié. Généralement, les cellules ostéoblastiques sont connues pour préférer les surfaces rugueuses (Chehroudi *et al.*, 1988; Degasne *et al.*, 1999; Hatano *et al.*, 1999; Zinger *et al.*, 2004) en opposition avec les fibroblastes qui prolifèrent mieux sur les surfaces lisses (Kononen *et al.*, 1992; Ponsonnet *et al.*, 2002; Wirth *et al.*, 2005). De la même manière, la rugosité des substituts vasculaires peut influencer l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales. Chung *et al.* ont, par exemple, comparé l'adhésion et la croissance *in vitro* de cellules endothéliales humaines à la surface de matériaux polyuréthanes présentant différentes rugosités. Ils ont, par cette étude, mis en évidence qu'une augmentation de la rugosité de 10 à 10² nm suffisait à stimuler l'adhésion des cellules endothéliales (Chung *et al.*, 2003).

Bien que tous les types cellulaires soient influencés par la rugosité, le comportement des cellules osseuses sur les surfaces rugueuses reste, à l'heure actuelle, le système le plus étudié. Bigerelle *et al.* (Bigerelle *et al.*, 2002) ont étudié l'effet de la rugosité d'implants en Ti-6Al-4V sur la réponse de cellules ostéoblastiques humaines issues de l'os trabéculaire. Après 21 jours de culture, l'adhésion sur les surfaces rugueuses (obtenues par électro-érosion) est supérieure comparativement aux surfaces polies. Ces résultats ont été reliés à l'hypothèse de Curtis et Clark (Curtis, 2004) qui considèrent que les surfaces réagissent aux discontinuités. Anselme *et al.* (Anselme, 2000) ont étudié l'impact de la rugosité de matériaux de comblement osseux sur la différenciation des ostéoblastes et ont montré que pour les cellules MG63 la synthèse de collagène augmente avec la rugosité, il en est de même pour l'activité de la phosphatase alcaline.

Cependant lors d'études concernant l'adhésion cellulaire, il est très difficile d'isoler la seule influence de la rugosité sur la réponse des cellules. C'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes de recherches ont développé des techniques de micro et nanofabrication dans le but de réaliser des gradients de rugosités en surface de biomatériaux. Ils ont ainsi pu comparer, sur une même surface, l'influence de la rugosité sur l'attachement, la migration et la prolifération cellulaire (Curtis et Wilkinson, 1997). Kunzler *et al.* ont développé une technique permettant de créer un gradient de rugosités à la surface d'aluminium dans le but d'étudier l'attachement et la prolifération d'ostéoblastes et de fibroblastes (Kunzler *et al.*, 2007). Une corrélation a pu être clairement établie entre l'augmentation du taux de prolifération et l'augmentation de la rugosité. A l'opposé, le taux de prolifération des fibroblastes diminue lorsque la rugosité augmente. De la même manière, Washburn *et al.* (Washburn *et al.*, 2004) ont, par réalisation de gradients de rugosités, démontré qu'il existe une rugosité minimale critique pour la prolifération. En effet, en dessous d'une rugosité moyenne de 1nm, le taux de prolifération des cellules ostéoblastes MC3T3-E1 diminue considérablement. De telles découvertes pourraient être appliquées dans le cadre d'implants dentaires. En effet, des surfaces à rugosité contrôlée permettraient, d'une part de prévenir l'adhésion des cellules épithéliales et d'autre part de stimuler la repousse osseuse sur certaines parties de l'implant.

(3) *Microstructuration de la surface*

Les paragraphes précédents ont mis en évidence l'influence de paramètres morphologiques tels que la porosité ou la rugosité sur la réponse des tissus environnants. Généralement ces études portent sur des surfaces modifiées de façon homogène cependant de nombreuses publications ont prouvé l'intérêt d'une structuration de la surface à une échelle micrométrique voire nanométrique pour contrôler les interactions matériaux-cellules (Kasemo et Gold, 1999).

Afin de mieux comprendre ces phénomènes, les chercheurs ont développé des techniques de microfabrication leur permettant de réaliser des surfaces à topographie contrôlée. Ces techniques seront détaillées dans le chapitre IV : « Micro- et nano-distribution de biomolécules en surface de matériaux ».

En 1996, Britland *et al.* (Britland *et al.*, 1997) ont étudié l'impact de la microtopographie sur l'adhésion de cellules neuronales de rat. Ils ont réalisé des domaines sur une lame de verre en faisant varier la largeur des lignes (12-, 25-, 50- et 100µm) mais également la profondeur des sillons (-50, -100, -500nm, 1-, 3- et 6µm). Pour des profondeurs de sillons inférieures à

1µm, aucun alignement n'a été constaté, un maximum ayant été atteint pour des domaines de 12µm de large et de 1µm de profondeur. Clark *et al.* (Clark *et al.*, 1990, , 1991) ont statué que l'influence de la topographie sur les réponses cellulaires dépend de la taille des domaines, de la profondeur des domaines mais également du nombre de domaines adjacents.

Aujourd'hui, de nombreuses équipes de recherche étudient l'effet de la topographie sur les cellules. Par exemple, Hamilton *et al.* (Hamilton et Brunette, 2007) ont cultivé des cellules ostéoblastiques de rat sur des surfaces présentant des microdomaines et se sont intéressés à la phosphorylation de la tyrosine. Après 6 semaines, les cellules cultivées sur des surfaces microstructurées présentent un taux de phosphorylation de la tyrosine élevée comparativement aux surfaces planes. Ils font alors l'hypothèse que les voies de signalisation conduisant à la phosphorylation de ERK ½ sont dépendantes de la topographie du substrat. Ces résultats peuvent cependant varier en fonction des substrats et des types cellulaires utilisés. Par exemple, Charest *et al.* (Charest *et al.*, 2007) ont étudié l'adhésion des myoblastes sur des domaines de tailles comprises entre 5- et 75µm et présentant des motifs différents. Dans tous les cas de figure les cellules se sont fortement alignées en fonction des domaines présents à la surface, cependant la densité de cellules adhérentes et la différenciation ne semble pas être affectées par la topographie.

B) Paramètres physico-chimiques

Lorsque l'on modifie un matériau dans le but d'améliorer sa biocompatibilité on altère, volontairement ou pas, ses caractéristiques physico-chimiques telles que l'énergie libre de surface, la charge ou la composition chimique. A ce jour, de nombreuses études tentent de déterminer l'influence des paramètres physico-chimiques sur la réponse cellulaire aux interfaces matériau-tissus.

(1) *Caractère hydrophile/hydrophobe*

Le caractère hydrophile/hydrophobe d'une surface est une propriété physico-chimique importante qui peut influencer les comportements biologiques tels que l'adsorption de protéines ou l'adhésion cellulaire.

De nombreuses études ont mis en évidence l'impact du caractère hydrophile/hydrophobe d'une surface sur l'adsorption de protéines et indirectement sur l'adhésion cellulaire. En effet, les premières secondes suivant l'implantation d'un biomatériau sont marquées par une

adsorption non spécifique de protéines. Les protéines adsorbées vont, de par leur nature, induire ou pas une adhésion cellulaire.

Ces dix dernières années la principale avancée dans l'élaboration de matériaux présentant des surfaces contrôlées est l'utilisation de monocouches auto-assemblées (Self-assembled monolayers : SAM's) (Whitesides *et al.*, 1993). Cette technique a permis à Rodrigues *et al.* de mettre au point des matériaux permettant de contrôler l'adsorption de fibrinogène et l'adhésion plaquettaire, éléments responsables de la formation de thrombus (Rodrigues *et al.*, 2006). Les surfaces élaborées sont des monocouches auto-assemblées composées d'un mélange, à des taux variables, de chaînes $C_{15}CH_3$ et $C_{11}OH$ et présentant des angles de contacts compris dans une gamme de $18,1^\circ$ à $106,7^\circ$. Ils ont ainsi démontré que l'adsorption du fibrinogène diminuait considérablement avec l'augmentation du caractère hydrophile de la surface. Il en est de même pour l'adhésion et l'activation plaquettaire. Wei *et al.* ont étudié l'adhésion de fibroblastes ainsi que l'adsorption de protéines sur des surfaces d'hexaméthylsiloxane, qui après traitement plasma, présentaient des angles de contacts variables. Ils ont ainsi mis en évidence qu'une surface hydrophile voire super hydrophile était plus favorable à l'attachement et à la prolifération des fibroblastes (Wei *et al.*, 2007). De plus, les surfaces hydrophiles semblent favoriser l'adsorption de la fibronectine alors que l'adsorption de l'albumine prédomine sur les surfaces hydrophobes.

Ce résultat a été récemment confirmé par l'étude de Yusuke Arima *et al.* (Arima et Iwata, 2007) qui a mis en évidence, par le biais de surfaces recouvertes de monocouches auto-assemblées, que l'albumine adsorbée à la surface de matériaux hydrophobes n'était pas, ou très peu, échangée avec les protéines adhésives. Au contraire, l'albumine adsorbée sur les surfaces hydrophiles est plus facilement déplacée par les protéines adhésives. En effet l'albumine est connue pour s'adsorber préférentiellement sur les surfaces hydrophobes (Absolom *et al.*, 1987; Martins *et al.*, 2003). Ceci s'explique par le fait que les molécules d'eau adsorbées sur les surfaces hydrophiles constituent une barrière énergétique trop importante pour permettre aux protéines d'atteindre la surface (Haynes et Norde, 1994).

Par ailleurs, des recherches ont également été effectuées en l'absence de sérum afin de mettre en évidence l'influence du caractère hydrophile/hydrophobe sur l'adhésion cellulaire (Van Wachem *et al.*, 1985; Van Wachem *et al.*, 1987). Un grand nombre de publications indiquent que les cellules ont tendance à adhérer de façon plus importante sur les surfaces hydrophiles que sur les surfaces hydrophobes (Groth et Altankov, 1996; Nakao *et al.*, 1996). Kim *et al.* ont mis au point des polymères présentant des caractères hydrophiles variés et

contrôlés et les ontensemencés avec des cellules humaines issues de la moelle osseuse. L'étude a montré que l'adhésion et l'étalement des cellules étaient beaucoup plus importants sur les surfaces hydrophiles que sur les surfaces hydrophobes (Kim *et al.*).

Cependant la compatibilité de tissus sur des matériaux à mouillabilité modérée peut varier en fonction de la nature de la surface. Parmi les paramètres influençant les interactions biologiques aux interfaces nous pouvons noter par exemple la charge de surface, la polarité, la présence de groupes fonctionnels, la structure de l'eau à la surface, la présence d'hétérogénéités ainsi que la formation de domaines cristallins ou amorphes (Altankov *et al.*, 2000; Lewandowska *et al.*, 1992; Mestries *et al.*, 1998).

(2) Charge de surface

Les interactions électrostatiques jouent un rôle capital dans de nombreux processus biologiques, elles peuvent par exemple affecter le devenir des protéines (adsorption, conformation) ou des cellules (adhésion, prolifération) aux interfaces. Des surfaces chargées négativement peuvent être obtenues par le revêtement ou le greffage de groupements acide ou sulfonate alors que la présence de groupements amine donnera une surface chargée positivement. Ces propriétés ont été largement étudiées, notamment pour la recherche sur les matériaux vasculaires. En effet les surfaces chargées négativement sont connues pour ralentir le phénomène de thrombose, contrairement aux surfaces chargées positivement qui l'accélèrent. Ceci s'explique par le fait que la surface de l'endothélium naturel est chargée négativement. De plus, à pH physiologique, la majorité des protéines plasmiques sont sous forme anionique. Par exemple, le fibrinogène, protéine impliquée dans la cascade de coagulation, possède un point isoélectrique à $pH_i = 5,6$, de ce fait, à pH physiologique il ne s'adsorbe que très peu sur les surfaces chargées négativement.

Il existe plusieurs méthodes pour obtenir des surfaces chargées mais à l'heure actuelle, le cas le plus étudié est le greffage de fonctions sulfonates en surface de matériaux pour augmenter leur hémocompatibilité.

De tels greffages permettent en effet de rendre, par l'introduction de fonctions chimiques, la surface chargée négativement et ainsi de repousser l'adsorption de protéines mais aussi mimer l'action anticoagulante de l'héparine (Lelah *et al.*, 1985). Dong Keun Han *et al.* ont prouvé que le greffage de poly(oxyde d'éthylène) sulfonaté à la surface de polyuréthane engendrait une diminution de l'adhésion et de l'activation des plaquettes et donc permettait

une meilleure biocompatibilité (Han *et al.*, 1996). Ces travaux ont depuis été confirmés par d'autres équipes de chercheurs (Skarja et Brash, 1997).

Webb *et al.* ont étudié l'influence de différents paramètres de surface, la mouillabilité et la charge de surface, sur l'adhésion et l'étalement de fibroblastes de souris. Ils ont prouvé que dans des conditions de culture sans protéines, le principal facteur responsable de l'adhésion cellulaire était la charge positive de surface (Webb *et al.*, 1998). En 2003, l'étude Altankov *et al.* a montré que l'évaluation du potentiel Zeta d'une surface s'avérait être un paramètre indispensable à une meilleure compréhension des interactions matériaux-cellules (Altankov *et al.*, 2003; Khorasani *et al.*, 2006).

(3) Composition chimique

La composition chimique de la surface des biomatériaux est un élément majeur dans la compréhension des phénomènes aux interfaces. Depuis le début des années 90, de nombreuses recherches se sont axées vers l'étude de l'influence de la chimie sur les processus biologiques. Les fonctions carboxyliques et amines sont utilisées en surface de nombreux matériaux synthétiques dans le but d'améliorer leur biocompatibilité. En effet ces fonctions chimiques composent majoritairement les matrices naturelles telles que les protéines et les glycosaminoglycanes.

De nombreux chercheurs utilisent aujourd'hui les SAM's pour créer des matériaux modèles, pour établir un lien entre les fonctions chimiques et les propriétés cellulaires (Barbosa *et al.*, 2004; Faucheux *et al.*, 2004; Karageorgiou et Kaplan, 2005). En 2006, Faucheux *et al.* ont utilisé des SAM's dans le but d'étudier l'influence des fonctions carboxyles et amines sur le comportement de fibroblastes. Ils ont mis en évidence que les fonctions carboxyles permettaient une migration cellulaire plus importante et que les différentes fonctions chimiques influençaient également la formation de matrice (Faucheux *et al.*, 2006). Cette technique peut également être utilisée pour l'immobilisation de peptides, de protéines ou d'autres biomolécules dans le but de préparer des surfaces biologiques (Kretsinger *et al.*, 2005).

De même, l'incorporation de fonctions chimiques sur une surface peut changer la conformation des protéines adsorbées et l'attachement des cellules sur le matériau. Par exemple, Sperling and al. (Sperling *et al.*, 2005) ont montré que l'adhésion des leucocytes et des plaquettes après une incubation dans du sang humain complet pouvait être attribuée aux fonctions chimiques présentes à la surface du matériau support. En effet, la présence de

fonctions $-CH_3$ inhibe l'adhésion des leucocytes alors que les fonctions $-OH$ la favorisent. Plus récemment, Janorka *et al.* ont élaboré des surfaces de poly-L-lactide modifiées par l'incorporation de fonctions $-NH_2$ et ont étudié l'adhésion de cellules MC3T3 (Janorkar *et al.*, 2007). L'analyse par microscopie optique montre une adhésion cellulaire plus importante sur les surfaces contenant les fonctions $-NH_2$ par rapport aux surfaces non modifiées.

La chimie de surface peut également être modifiée de manière plus radicale en introduisant par revêtement ou par greffage des macromolécules. L'exemple le plus étudié à l'heure actuelle est le greffage de Poly (oxyde d'éthylène) (POE), en particulier dans le cas de prothèses vasculaires. L'adsorption de protéines et l'attachement cellulaire sur de tels matériaux dépend alors essentiellement de la densité surfacique de greffage et de la longueur des chaînes de polymère. Zhu *et al.* ont corrélé l'adhésion de fibroblastes de souris en fonction de la longueur des chaînes de POE greffées sur des surfaces modèles (Zhu *et al.*, 2001). En effet la longueur des chaînes de polymères influence l'adsorption des protéines du sérum à la surface du matériau et donc induit des différences d'attachement cellulaire.

Néanmoins, toute la complexité de ces études réside dans le fait qu'il est impossible de ne faire varier qu'une propriété à la fois. En effet la modification des fonctions chimiques de surface est indissociable du caractère hydrophile ou de la charge voire de la rugosité de surface.

C) Paramètres biologiques

Les modifications biologiques de surface font appel à de nombreuses connaissances sur l'adhésion et la différenciation des cellules. Ces dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes cellulaires et de leurs interactions avec les biomolécules. Le but des modifications biologiques de surface est de contrôler les réponses cellulaire et tissulaire sur un implant en immobilisant des biomolécules à sa surface. Les modifications biologiques peuvent faire intervenir différents types de biomolécules tels que les facteurs de croissance ou les molécules d'adhésion cellulaire.

(1) Incorporation de facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont de puissants régulateurs impliqués dans de nombreux comportements cellulaires tels que la prolifération, la migration, la différenciation et l'expression des protéines. L'activité biologique de ces facteurs de croissance dépend non seulement de leur identité, mais également de la façon dont ils sont présentés aux cellules, que

ce soit dans l'espace ou dans le temps. Par exemple, il a été démontré que certains facteurs de croissance étaient plus actifs lorsqu'ils étaient délivrés progressivement aux cellules alors que d'autres doivent être délivrés de façon rapide. Dans les conditions naturelles du corps humain, la matrice extracellulaire a pour rôle de stocker et de libérer ces facteurs de croissance. C'est la raison pour laquelle la recherche biomédicale s'est tournée vers l'immobilisation de ces molécules en surface de biomatériau afin de mimer au mieux la fonction de la matrice extracellulaire. Wong *et al.* ont montré que l'incorporation et la délivrance contrôlée de facteurs des croissances angiogènes bFGF, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₂₁ favorisaient la néovascularisation (Wong *et al.*, 2003). Il en est de même pour ce qui concerne la réparation osseuse. En effet, l'immobilisation de la BMP4 (Bone Morphogenic Protein) à la surface d'un alliage de titane, induit une forte activité ostéoblastique (activité de la phosphatase alcaline) pour les cellules pluripotentes C3H10T1/2 (Puleo *et al.*, 2002). A l'heure actuelle le système le mieux connu est la combinaison de facteurs de croissance épidermiques en surface de polymères synthétiques. Il a en effet été prouvé que la présence de tels facteurs de croissances en surface de biomatériaux permettait aux hépatocytes de conserver leur morphologie et leurs fonctions biologiques (Kuhl et Griffith-Cima, 1996).

(2) *Incorporation de molécules adhésives*

L'adhésion cellulaire sur des matériaux tels que le polyéthylène ou le polytétrafluoroéthylène est basée sur une reconnaissance indirecte. En effet, les protéines des fluides corporels s'adsorbent de manière non spécifique à la surface des matériaux et certaines de ces protéines, comme la fibronectine, le fibrinogène et la vitronectine, favorisent l'adhésion des cellules en interagissant avec les récepteurs cellulaires appropriés. Afin de contrôler l'adhésion spécifique des cellules, la recherche actuelle vise à immobiliser, de façon covalente ou par incorporation physico-chimique, des oligopeptides ou des oligosaccharides capables de promouvoir l'attachement cellulaire. Des travaux ont rapidement démontré l'intérêt de travailler avec des séquences peptidiques courtes plutôt qu'avec des protéines car ils résistent mieux aux variations de pH et de température. L'utilisation de ces peptides peut alors permettre une colonisation contrôlée des cellules (Chapitre III-C-2 : « Peptides ou protéines ? »).

L'intégrine $\alpha_4\beta_1$, qui est présente dans le cas des cellules endothéliales mais pas dans les plaquettes, est un récepteur spécifique du térapeptide REDV. L'immobilisation d'un tel peptide en surface de prothèses vasculaires permettrait alors, dans le cadre d'études *in vitro*,

d'une part d'augmenter l'adhésion et la migration des cellules endothéliales et d'autre part de réduire voire d'inhiber l'adhésion des plaquettes responsables de la thrombose (Massia et Hubbell, 1992).

De la même manière, il est connu que l'os un tissu qui nécessite lors de sa formation, la présence de cellules ostéoblastiques mais également de cellules endothéliales responsables de sa vascularisation (Pelissier *et al.*, 2003; Villars *et al.*, 2000). Une stratégie serait le développement de matériaux fonctionnalisés à la fois par des ligands spécifiques des cellules endothéliales (YIGSR) et des ligands spécifiques des ostéoblastes. La séquence RGD étant à la fois reconnue par les ostéoblastes et par les cellules endothéliales, il s'agira d'identifier la séquence peptidique (linéaire, cyclique, mime peptidique, voir Chapitre III-D : « Les différents peptides contenant la séquence RGD ») la plus spécifique des ostéoblastes.

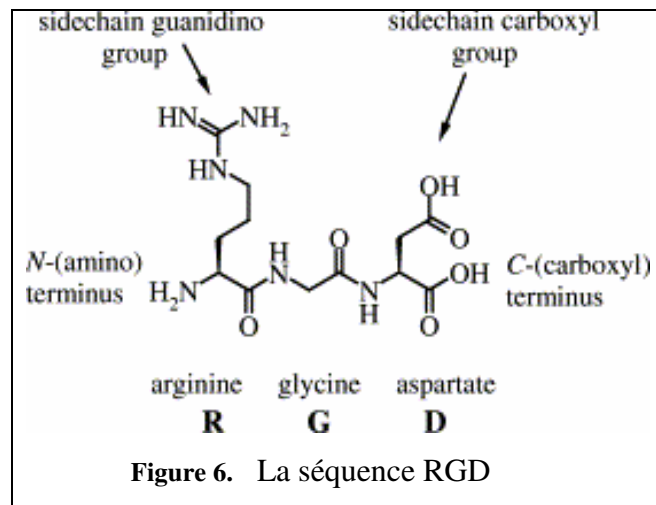
A l'heure actuelle, la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) est de loin la séquence peptidique la plus efficace et la plus employée pour stimuler l'adhésion cellulaire en surface de matériaux. Depuis la découverte de cette séquence peptidique comme ayant un rôle médiateur de l'attachement cellulaire (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984), de nombreux scientifiques ont déposé des peptides contenant cette séquence particulière en surface de biomatériaux pour promouvoir l'adhésion des cellules (Bartouilh de Taillac *et al.*, 2004; Garland et Cooper, 2004; Porte-Durrieu *et al.*, 2004; Ruoslahti et Pierschbacher, 1987).

III. Le peptide RGD

A) Généralités

En 1984, une séquence térapeptidique de la fibronectine a été reconnue pour ses fonctions de reconnaissance cellulaire : le térapeptide actif est Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984). Mais il a été établi postérieurement que la séquence tripeptidique RGD est l'unité fonctionnelle minimale permettant la conservation de l'activité d'attachement des cellules. D'une part, la séquence RGD en solution inhibe l'adhésion cellulaire sur une surface recouverte de fibronectine et d'autre part stimule l'attachement cellulaire lorsqu'elle est immobilisée sur une surface. La figure 6 représente la séquence RGD. Depuis leur découverte, les peptides RGD ont été identifiés dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire telles que la vitronectine, le fibrinogène, le facteur de Von Willebrand, le collagène, la laminine, l'ostéopontine... mais également dans des protéines

membranaires, des protéines bactériennes ou virales et dans le venin de serpent (neurotoxines et disintégrines) (Ruoslahti, 1996).



Les récepteurs membranaires appartenant à la super-famille des intégrines reconnaissent cette séquence RGD et favorisent l'attachement. Ces intégrines jouent un rôle majeur dans l'adhésion cellulaire mais également au cours de l'embryogénèse, de la différenciation cellulaire, de la réponse immunitaire et de l'hémostase. Les intégrines favorisent les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire, et du côté intracellulaire, elles réagissent avec les éléments du cytosquelette. Les intégrines sont des hétérodimères formés de deux sous-unités, α et β , liées de manière non covalente, qui contiennent dans leur portion extracellulaire des sites de liaison spécifiques dont l'activité requiert la présence de calcium et qui reconnaissent la séquence tripeptidique, Arg-Gly-Asp (RGD) (Figure 7).

Actuellement, on dénombre 17 sous-unités α et 8 sous-unités β , ce qui constitue un grand nombre de combinaisons possibles. Malgré cela, seulement 24 intégrines ont été découvertes à ce jour. La combinaison particulière des sous-unités α et β détermine le ligand spécifique de l'intégrine. Environ la moitié des 24 intégrines sont connues pour être RGD dépendantes : $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha \text{IIb}\beta 3$, $\alpha \nu\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$, $\alpha \nu\beta 6$, $\alpha \nu\beta 8$, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$ (Tableau 7) (Ruoslahti, 1996).

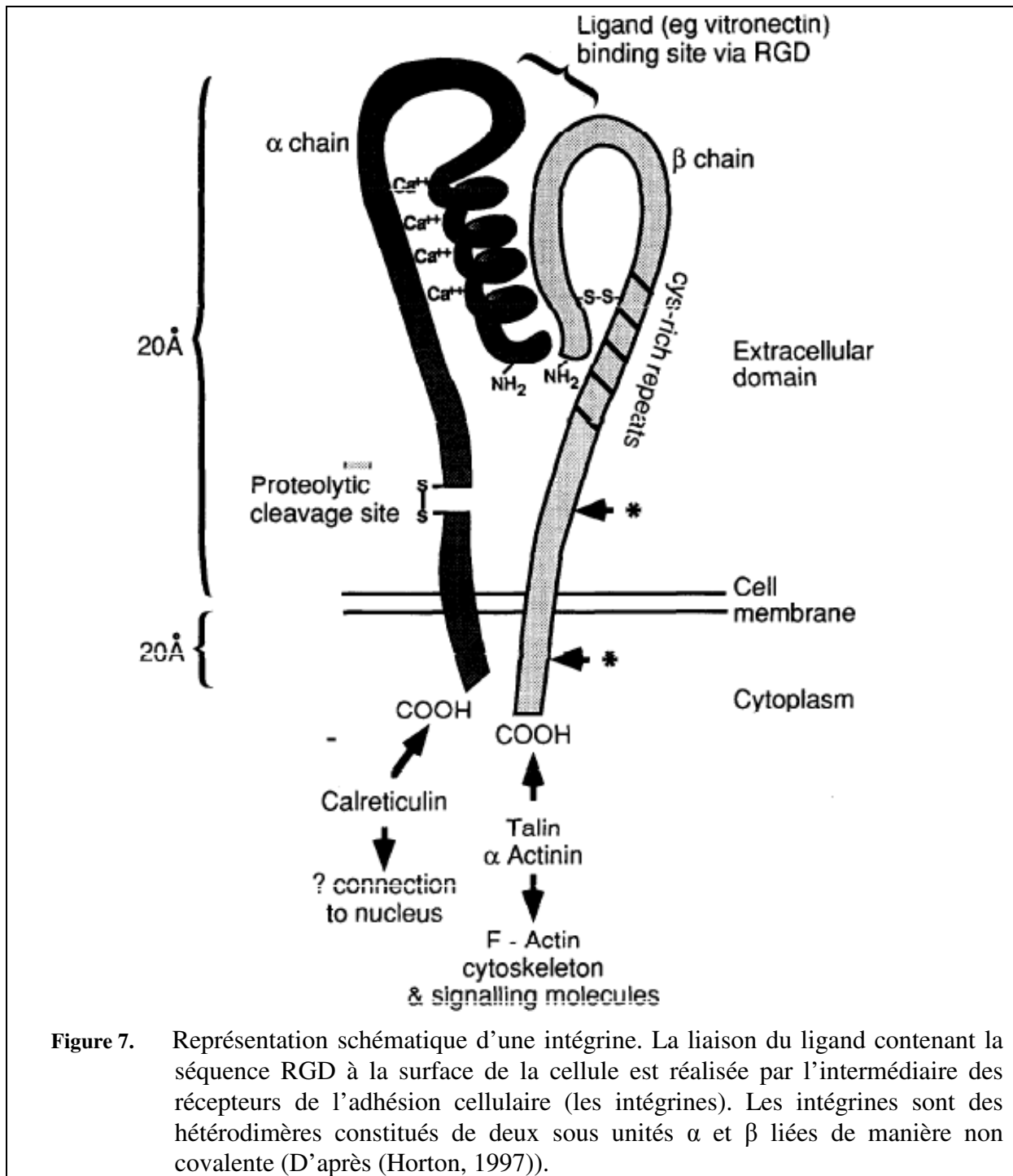


Figure 7. Représentation schématique d'une intégrine. La liaison du ligand contenant la séquence RGD à la surface de la cellule est réalisée par l'intermédiaire des récepteurs de l'adhésion cellulaire (les intégrines). Les intégrines sont des hétérodimères constitués de deux sous unités α et β liées de manière non covalente (D'après (Horton, 1997)).

Tableau 7. Séquences de liaison des protéines de la matrice extracellulaire aux intégrines (D'après (Hynes, 1992))

Sous-unités intégriniques		Ligands	Séquence de liaison minimale
Sous-unités β	Sous-unités α		
$\beta 1$	$\alpha 1$	collagènes, laminine	-
	$\alpha 2$	collagènes, laminine	DGEA
	$\alpha 3$	fibronectine, collagènes,	RGD
	$\alpha 4$	laminine	EILDV
	$\alpha 5$	fibronectine, VCAM-1	RGD
	$\alpha 6$	fibronectine	-
	$\alpha 7$	laminine	-
	$\alpha 8$?	-
	αv	vitronectine, fibronectine	RGD
$\beta 2$	αL	ICAM-1, ICAM-2, élément C_{3b} du complément (inactivé)	-
	αM	ICAM-1, C_{3b} , fibrinogène, facteur x	-
	αx	C_{3b} , fibrinogène	GPRP
$\beta 3$	αIIb	fibrinogène, fibronectine, facteur Von Willebrand (vWF), vitronectine, thrombospondine	RGD, KQAGDV
	αv	vitronectine, fibrinogène, vWF, fibronectine, ostéopontine, collagènes	RGD
$\beta 4$	$\alpha 6$	laminine	-
$\beta 5$	αv	vitronectine	RGD
$\beta 6$	αv	fibronectine	RGD
$\beta 7$	$\alpha 4$	fibronectine, VCAM-1	EILDV

B) Mécanismes de l'adhésion cellulaire

Comme présenté dans le chapitre précédent, les liaisons peptides-intégrines sont à la base de nombreux phénomènes biologiques, notamment les phénomènes d'adhésion cellulaire.

En effet, l'adhésion cellulaire réalisée par le biais des intégrines comprend une cascade de quatre évènements (Lebaron et Athanasiou, 2000): l'attachement cellulaire, l'étalement cellulaire, l'organisation du cytosquelette d'actine et la formation de contacts focaux (agglutination des intégrines). Un grand nombre de réactions de signalisation suivant la formation des adhésions focales sont connues. Celles-ci incluent l'activation de la FAK, des ERK (*extracellular signal regulated kinase*), des *Rho GTPases*, de la phosphatidyl inositol 4-phosphate 5-kinase (PIP 5-kinase) et d'autres voies des MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Geiger et Bershadsky, 2001; Schwartz, 2001; Van der Flier et Sonnenberg, 2001). Bien que tous les détails ne soient pas connus, de nombreuses équipes de recherche axent leur thématique sur la compréhension des mécanismes cellulaires, notamment sur la formation de plaques focales d'adhésion.

(1) Les plaques d'adhésion focale

Lors du processus d'adhésion, les cellules lient les protéines de leur cytosquelette aux protéines de la matrice extra-cellulaire ou aux séquences peptidiques spécifiques par le biais des intégrines (Figure 8). Suite à la liaison des intégrines à leurs ligands, elles s'agglomèrent et recrutent des protéines telles que l' α -actine, la vinculine, la tensine et la paxilline pour ainsi former et renforcer les contacts focaux liant le cytosquelette aux intégrines (Sastry et Burridge, 2000). Trois types d'adhésion cellulaire, impliquant tous la liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine, ont été décrits et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 8. A l'heure actuelle l'adhésion focale (contacts focaux) est de loin le phénomène le plus étudié. Les complexes focaux sont les sites précurseurs de l'adhésion focale et sont fortement impliqués dans la migration cellulaire.

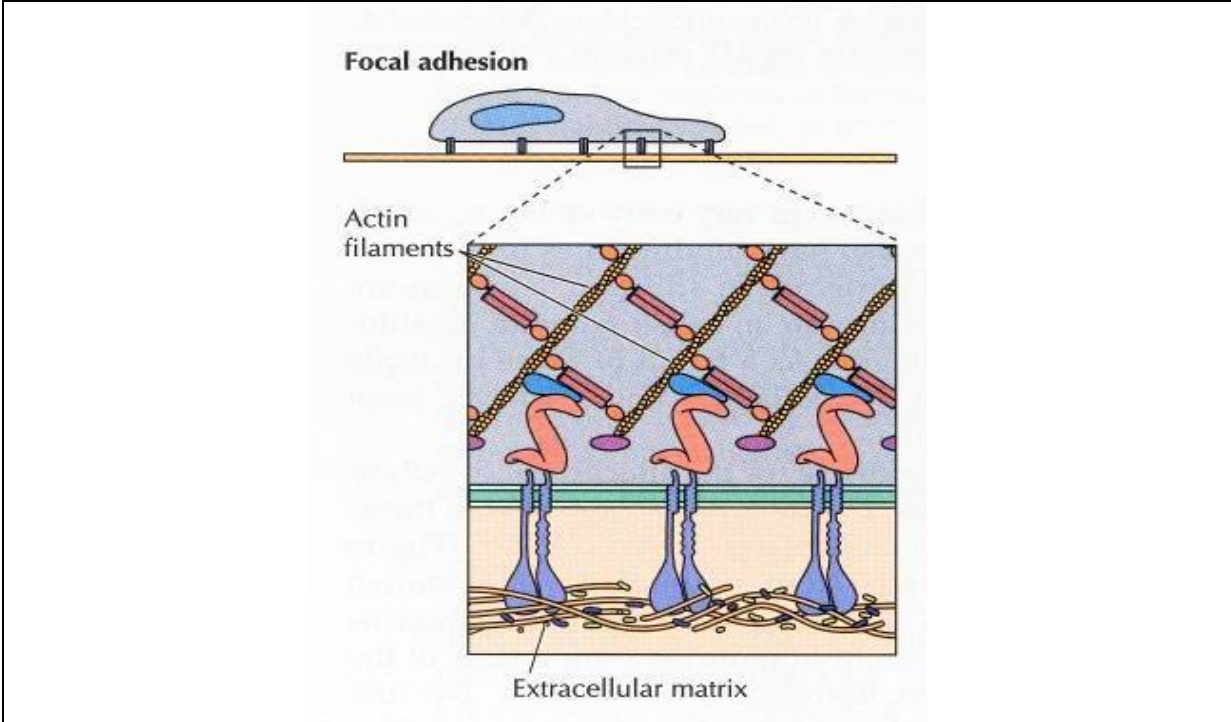


Figure 8. Les intégrines, composés de deux sous-unités α et β , jouent un rôle important dans l'attachement cellulaire en formant une liaison entre les protéines de la matrice extra cellulaire (MEC) d'une part, et les éléments du cytosquelette de la cellule d'autre part. Les intégrines lient les domaines d'adhésion des protéines de la MEC par reconnaissances spécifiques de ces sites. La séquence RGD, présente dans la fibronectine et dans beaucoup d'autres protéines d'adhésion cellulaire, est l'unité fonctionnelle minimale permettant la conservation de l'activité d'attachement des cellules.

Tableau 8. Caractéristiques des différents types d'adhésion cellulaire (D'après (Geiger *et al.*, 2001))

Propriétés	Complexes focaux	Adhésions focales	Adhésions fibrillaires
Localisation	Bord du lamellipode	Périphérie	Au centre de la cellule
Morphologie	Ponctiforme	Oblongue	Fibrillaire
Dimension	1 μ m	2-5 μ m	Variable : 1-10 μ m
Protéines associées	Paxilline, vinculine, protéines p-Tyr	Intégrine α_v , paxilline, vinculine, α -actine, taline, FAK, protéines p-Tyr	Intégrine α_5 , tensine

(2) Les protéines de signalisation intracellulaire associées au contact focal

L'adhérence et l'agrégation des intégrines au substrat initient l'activation de multiples voies de signalisation dépendantes des protéines kinases et des Rho GTPases (« guanosine triphosphate (GTP)-binding proteins »), et modifient la synthèse des phospholipides. Ces modifications signalétiques réglementent la réorganisation du cytosquelette, l'étalement, la migration, la différenciation, la survie et la division cellulaire (Geiger *et al.*, 2001). Les différentes voies de signalisation de l'adhésion focale sont représentées dans la figure 9.

Parmi les voies de signalisation prenant naissance aux foyers d'adhésion, les plus étudiées sont celles qui impliquent la « focal-adhesion kinase » (FAK). La phosphorylation sur des résidus tyrosine de FAK, après autophosphorylation des intégrines, est un événement important lors de l'activation du complexe Ras-MAPK. L'activation de FAK entraîne, entre autres l'activation de ERK, un important régulateur de la prolifération, de la survie et de la migration cellulaire (Howe *et al.*, 2002).

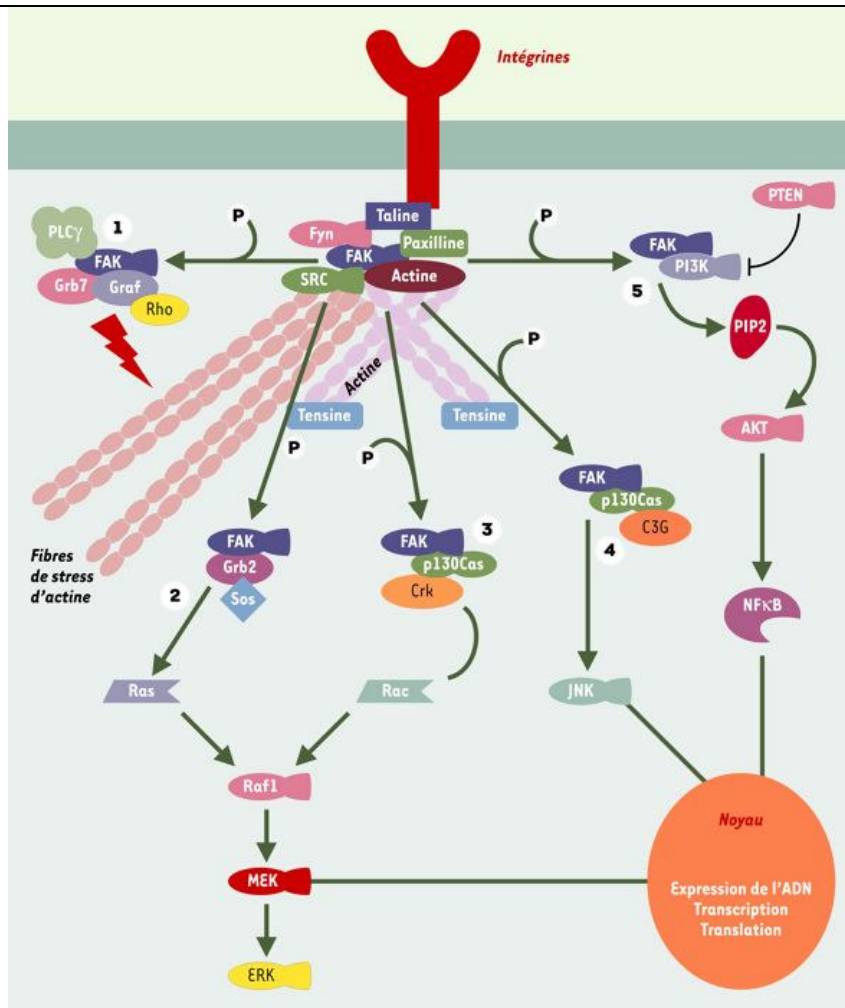


Figure 9. Les voies de signalisation de l'adhésion focale, d'après (Cornillon *et al.*, 2003). Le schéma simplifié propose un résumé des possibilités d'interaction entre les protéines du complexe d'adhésion et les voies de signalisation sous-jacentes. FAK est initialement activée par l'intermédiaire d'intégrines et/ou de facteurs de croissance. Cette activation va permettre la liaison et l'activation de plusieurs protéines. (1) Graf, Grb7, PLC- γ . vont participer au remaniement du cytosquelette d'actine, engendrant ainsi un cycle de migration et d'adhérence cellulaires avec pour chaque étape une restructuration et une déstructuration des complexes d'adhérence. p130^{Cas}, Grb2, PI3-kinase vont secondairement participer à l'activation en cascade de plusieurs voies intracellulaires, la voie de ERK (2 et 3), la voie de JNK (4) et la voie de la PI3-kinase (5). Elles vont permettre *in fine* de régler plusieurs processus vitaux pour la cellule telles que la survie, la prolifération et la migration cellulaires en favorisant l'activation de facteurs de transcription.

AKT: protéine kinase AKT; FAK: focal adhesion kinase; ERK: extracellular signal-regulated kinases; Fyn: tyrosine kinase Fyn; Graf: GTPase regulator associated with focal adhesion kinase; Grb2, Grb7: growth factor receptor-bound protein 2, 7; JNK: jun N-terminal kinases; MEK: MAP erk kinase; NF κ B: nuclear factor KB; p130Cas: protéine de 130 kDa associée à Crk (Crk-associated substrate); PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase; PIP2: phosphatidyl inositol bisphosphate; PLC γ : phospholipase C γ ; Raf1: rapamycine FKBP target 1; Rac: GTPase rac; Ras: GTPase ras; SRC: tyrosine kinase src; Sos: protéine sos.

C) Modification de surfaces par les peptides RGD

Peu après la découverte des peptides RGD, des chercheurs issus de la science des matériaux, de l'ingénierie de surface, de la chimie, de la physique, de la biologie, de la biochimie et de la médecine ont tenté de fonctionnaliser des matériaux dans le but d'obtenir une adhésion spécifique des cellules sur la surface. Un grand nombre d'études ont montré que l'immobilisation de peptides RGD en surface de matériaux favorisait l'adhésion de nombreux types cellulaires, notamment les cellules endothéliales (Garland W. Fussell 2004; Kouvroutoglou *et al.*, 2000; Massia et Hubbell, 1992; Porté-Durrieu *et al.*, 1999) ainsi que des ostéoblastes (Bartouilh de Taillac *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2003; Martin Kantlehner, 2001; Pallu *et al.*, 2005; Porte-Durrieu *et al.*, 2004) (Figure 10).

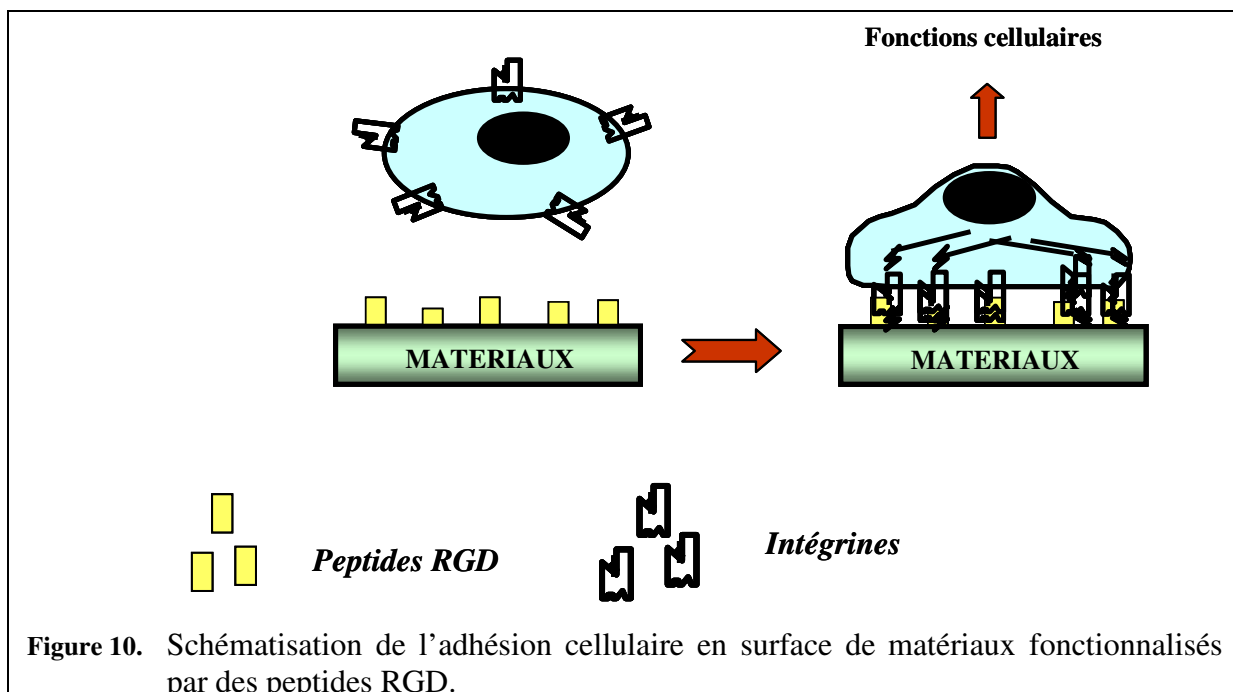


Figure 10. Schématisation de l'adhésion cellulaire en surface de matériaux fonctionnalisés par des peptides RGD.

(1) Revêtement ou greffage de peptides ou de protéines contenant la séquence RGD

Une liaison stable des peptides RGD en surface est essentielle pour permettre une forte adhésion cellulaire (Choquet *et al.*, 1997). En effet, la formation des plaques d'adhésions focales ne peut apparaître que si les ligands résistent aux forces contractiles des cellules (Dettin *et al.*, 2002). Cependant les techniques d'adsorption de peptides/protéines présentent des inconvénients. En effet, les peptides/protéines adsorbés sur une surface ont la possibilité de se désorber et/ou de s'échanger avec les protéines circulantes. Afin de permettre une liaison stable peptides/surface, les peptides RGD doivent être greffés de manière covalente au matériau, c'est-à-dire via des groupements fonctionnels tels que fonctions carboxyliques,

hydroxyles, ou amines. Le greffage de peptides contenant une séquence RGD sur une surface, présente alors de nombreux avantages par rapport à un simple revêtement : une désorption nulle, la minoration de l'amputation protéolytique des séquences peptidiques, le contrôle de la présentation de la séquence (c'est-à-dire C- ou N- terminal) et la possibilité d'orienter l'arrangement spatial de la séquence ou des séquences choisies (Irvine *et al.*, 2001; Massia et Hubbell, 1991).

(2) Peptides ou protéines ?

Dans les premiers temps, les fonctionnalisations de surface par les peptides RGD ont été réalisés par des revêtements de protéines adhésives de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, le collagène ou la laminine. Cependant, l'utilisation de protéines amène de nombreux inconvénients dans le cadre d'une utilisation médicale. Premièrement, les protéines doivent être isolées à partir d'autres organismes et purifiées. Elles peuvent donc induire une réponse immunitaire et augmenter les risques d'infection. Elles sont également soumises à des dégradations protéolytiques et ont besoin d'être renouvelées constamment, une implantation à long terme n'est donc pas envisageable. De plus, seulement une partie des protéines peut prétendre à une conformation propice à l'adhésion cellulaire, et ce, à cause de leur orientation stochastique en surface des matériaux (Elbert et Hubbell, 2001). En effet, la texture de la surface, déterminée par la charge, la mouillabilité et la topographie peuvent influencer la conformation et/ou l'orientation des protéines (Fields *et al.*, 1998). Cela peut entraîner la dénaturation des protéines ou du moins une présentation différente au niveau des sites de liaison cellulaire (Horbett et Lew, 1994). Récemment, Lord *et al.* (Lord *et al.*, 2006) ont élaboré un matériau en silice recouvert d'une solution colloïdale et ont fait adsorber de la fibronectine à sa surface. L'utilisation d'une microbalance à quartz a démontré que la quantité de fibronectine adsorbée sur la surface modifiée et sur le surface native était la même. Cependant après l'adsorption, la capacité de couplage de la fibronectine à un anticorps monoclonal anti-fibronectine spécifique sur la surface de silice modifiée était nettement réduit comparativement à la surface de silice non modifiée. De même, l'adhésion et la prolifération de cellules endothéliales humaines étaient fortement diminuées sur la surface modifiée par rapport à la silice. Ces résultats suggèrent que les changements de conformation de la fibronectine, induits lors de l'adsorption sur la silice modifiée, diminuent l'accessibilité à certains sites de liaison spécifiques de cette protéine.

La majorité des problèmes discutés ci-dessus peuvent être abolis en utilisant des petits peptides contenant les motifs de reconnaissance cellulaire. Ceux-ci exhibent une plus grande stabilité au niveau des conditions de stérilisation, des variations de pH (Ito *et al.*, 1991), des expositions à la chaleur, ils présentent également des facilités de stockage (Boxus *et al.*, 1998), sont plus faciles à caractériser et sont d'un moindre coût. Compte tenu du faible encombrement des peptides, ceux-ci peuvent être fixés avec une plus haute densité en surface ce qui peut compenser une éventuelle activité d'adhésion cellulaire affaiblie. La sélection de différentes séquences RGD se fait par l'utilisation de différents acides aminés comme voisins de cette séquence minimale.

D) Les différents peptides contenant la séquence RGD

Il existe à l'heure actuelle de nombreux peptides contenant, ou mimant la séquence RGD. Il peut s'agir de peptides linéaires, cycliques ou de mimes peptidiques.

(1) Les peptides linéaires

Même si la séquence RGD est connue depuis longtemps pour être la séquence peptidique minimale nécessaire aux phénomènes d'adhésion cellulaire, il est rapidement apparu que cette séquence perdait sa spécificité lorsqu'elle était isolée des protéines (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984). En effet, la séquence RGD seule est inactive, cependant son activité peut être préservée en bloquant le groupement carboxyle du C terminal ou en l'entourant d'autres acides aminés. L'activité et la sélectivité de différentes séquences RGD se fait donc par l'utilisation de différents acides aminés comme voisins de cette séquence minimale. Pierschbacher et Ruoslahti ont réalisé le classement des quelques peptides en fonction de leur activité biologique : RGD (inactive) < RGD-NH₂ < RGDS < GRGDSP (Pierschbacher et Ruoslahti, 1987).

Verrier *et al.* ont confirmé ces résultats en s'intéressant à l'effet de la séquence de peptides contenant les acides aminés RGD sur l'adhésion cellulaire (Verrier *et al.*, 2002). Des surfaces ont été revêtues de protéines de la matrice extracellulaire, et des essais d'inhibition cellulaire avec différents peptides linéaires contenant la séquence RGD ont été réalisés. Ces travaux ont montré que les séquences RGD et GRGD étaient inactives alors que les séquences RGDS, GRGDS et GRGDSP inhibaient l'adhésion cellulaire de 100%. Ils ont ainsi démontré l'intérêt de la Sérine aux côtés de la séquence RGD.

(2) Les peptides cycliques

Depuis plusieurs années, différents peptides cycliques ont été synthétisés et fixés en surface de matériaux afin de mettre en évidence l'intérêt d'une conformation différente vis-à-vis des récepteurs intégriniques. En effet, van der Pluijm *et al.* (van der Pluijm *et al.*, 1996) et Delforge *et al.* (Delforge *et al.*, 1998) ont montré une augmentation de l'attachement cellulaire en utilisant leurs peptides cycliques comparativement à des peptides linéaires. Par ailleurs, le peptide cyclique c(-RGDfX-) pour lequel l'acide aminé D suit la fonction aspartate induit une conformation de la séquence RGD telle que celle-ci est mieux reconnue par les intégrines αv et présente une affinité très largement réduite vis-à-vis des récepteurs plaquettaire $\alpha IIb\beta 3$ (Kantlehner *et al.*, 1999; Kantlehner *et al.*, 2001). Depuis de nombreux chercheurs ont comparé l'efficacité des peptides linéaires et des peptides cycliques. En 2004, Porté-Durrieu *et al.* ont greffé des peptides linéaires (RGDC) et des peptides cycliques (cyclo-DfKRG) à la surface de Ti-6Al-4V et ont comparé leur influence sur l'adhésion de ostéoprogéniteurs humains à 3, 6 et 24h (Porte-Durrieu *et al.*, 2004). Dans les temps courts, les peptides induisent une augmentation de l'adhésion cellulaire comparativement au titane non fonctionnalisé, mais il n'apparaît aucune différence entre le peptide linéaire et le peptide cyclique. Cependant, après 24h de culture, une claire augmentation de l'adhésion cellulaire a pu être observée dans le cas du peptide cyclique par rapport au peptide linéaire. Les auteurs ont donc conclu que le greffage de peptides RGD, linéaires ou cycliques, en surface de Ti-6Al-4V permettait de favoriser l'adhésion cellulaire mais que néanmoins, à 24h, les peptides cycliques constituaient un meilleur ligand que les peptides linéaires.

(3) Les mimes peptidiques

A l'heure actuelle, de nombreuses recherches visent à élaborer des molécules capables de mimer les effets des peptides, il s'agit des mimes peptidiques. Depuis une dizaine d'années, l'équipe de J. Marchand-Brynaert a ainsi développé de nombreux mimes capables de favoriser l'attachement de plusieurs types cellulaires (Boxus, 1996; Boxus *et al.*, 1998; Marchand-Brynaert, 1999; Marchand-Brynaert *et al.*, 1995). Par exemple, Biltresse *et al.* ont réalisé une gamme de mimes peptidiques en faisant varier de nombreux paramètres tels que la flexibilité de la chaîne latérale ou la taille du bras espaceur (Biltresse *et al.*, 2004). Dans tous les cas, une préincubation des cellules CaCo2 dans une solution contenant des peptides inhibait leur adhésion sur les surfaces préalablement recouvertes de vitronectine. De plus, l'immobilisation

de ces peptides en surface de polyéthylène téréphtalate était capable d'induire l'adhésion des cellules, de la même manière que la séquence RGD.

Ehteshami *et al.* ont également synthétisé une molécule, à partir de lysine et d'arginine, capable de mimer l'activité biologique de la séquence GRGDSPC (Ehteshami *et al.*, 2005). Une fois immobilisée à la surface de lames de verre, le peptide naturel et le mime ont la même influence sur l'adhésion cellulaire et la molécule synthétique exhibe une meilleure stabilité aux dégradations protéolytiques. De plus, des tests d'inhibition d'attachement cellulaire ont montré que le mime peptidique était capable d'interagir avec les intégrines des cellules, de la même manière que la séquence GRGDSPC.

Quoiqu'il en soit, dans toutes les études s'intéressant à la comparaison de l'activité de différents peptides (linéaires, cycliques, mimes) sur l'adhésion cellulaire, l'hypothèse formulée au départ est que la densité ainsi que la distribution de ces différents peptides est la même.

E) Intérêt d'un bras espaceur entre le RGD et le matériau

Une surface fonctionnalisée uniformément par des peptides RGD est vraisemblablement très différente d'une surface naturelle représentée par la matrice extracellulaire (ECM) où les motifs de reconnaissance sont distribués d'une manière complexe (Cukierman *et al.*, 2001; Geiger, 2001). En effet, les motifs de reconnaissance cellulaire influencent le comportement cellulaire autant par leur présence que par leur distribution. De la même manière que pour la présentation de la séquence RGD dans une boucle de la protéine, le peptide RGD doit « ressortir » de la surface artificielle afin d'atteindre le site de liaison de l'intégrine. Des études préliminaires ont mis en évidence l'intérêt d'un bras espaceur entre la séquence RGD et le site d'ancrage afin de favoriser l'attachement cellulaire (Craig *et al.*, 1995). Dans une étude détaillée, Beer *et al.* (Beer *et al.*, 1992) testent l'influence de la longueur de chaînes peptidiques sur l'adhésion plaquettaire en surface de billes de poly(acrylonitrile). Les différentes longueurs ont été obtenues en couplant un nombre croissant de glycine (1 à 19) à l'azote terminale du peptide. Une faible adhésion plaquettaire est observée dans le cadre de l'utilisation d'une triglycine. L'adhésion plaquettaire augmente en additionnant un nombre plus important de glycine et celle-ci atteint un maximum lors de l'utilisation de 13 glycines. Les auteurs concluent qu'en prenant l'hypothèse d'une longueur de 3,5 Å par glycine, la majorité

des sites de liaison RGD peuvent être atteints par les peptides qui s'étendent au-delà d'approximativement 11–32 Å de la surface.

Des études similaires ont été réalisées par Biltresse *et al.* (Biltresse *et al.*, 2005). Dans leur étude, ils ont testé plusieurs bras espaceurs entre des mimes peptidiques et des surfaces de PET, et ont ainsi démontré que l'action pro-adhésive des mimes peptidiques sur les cellules CaCo2 était plus importante lors de l'utilisation d'un bras en triéthylène glycol (13,5 Å) comparativement à un bras $-(CH_2)_3$ (6 Å).

Il existe cependant certains exemples qui montrent qu'un greffage peptidique ne nécessite pas forcément de bras espaceur pour favoriser l'attachement cellulaire (Hubbell *et al.*, 1991).

F) Greffage de peptides RGD à la surface d'un matériau

(1) Modification de la surface des polymères

Afin d'obtenir une liaison stable les peptides RGD doivent être fixés de manière covalente à la surface des polymères par le biais de groupements fonctionnels tels que des fonctions hydroxyles, amines ou carboxyles. Cependant de nombreux polymères ne contiennent pas ou peu de groupements fonctionnels à la surface, il est donc nécessaire de les introduire par différents traitements. Les différentes voies possibles sont :

- Le mélange de polymères : la présence de groupements réactionnels sont alors assurés par un des polymères. Le poly (tétrafluoro éthylène) (PTFE) (Walluscheck *et al.*, 1996), le polystyrène (PS) (Varani *et al.*, 1993) et le poly (acide lactique) (PLA) peuvent par exemple être revêtus de poly (L-lysine) (PLL), de cette manière les fonctions amines de la PLL peuvent servir de site réactionnel.
- La copolymérisation : la copolymérisation d'un mélange de deux monomères est une autre manière d'introduire des groupes fonctionnels à la surface de polymères. Dans le cas du polyéthylène (PE) (Hirano *et al.*, 1993) et du polystyrène (PS) (Ito *et al.*, 1991), la copolymérisation avec l'acide acrylique est couramment utilisée.
- Traitement chimique et physique : cette stratégie vise à introduire des groupes réactifs en modifiant la surface par hydrolyse, oxydation, réduction, track-etching ou dépôt plasma.

(a) Modifications du polyéthylène téréphtalate (PET)

Le polyéthylène téréphtalate contient, de part son mode de polymérisation, naturellement des fonctions carboxyles et hydroxyles en fins de chaînes (Figures 2 et 3). Par comparaison avec d'autres polymères où chaque unité monomère possède son site réactionnel (PMMA, PEEK), il apparaît nettement que le PET est déficient en sites d'ancrages. Il est cependant possible d'exacerber les fonctions en présence ou de créer de nouveaux groupements fonctionnels. La voie la plus utilisée dans le cas du PET est « le traitement chimique et physique » de la surface.

3- Traitement par voie chimique

Lors d'une modification par attaque chimique, le PET est mis en contact avec un liquide afin de générer des sites réactionnels à sa surface. Dans le cas du PET, les modifications à l'interface solide-liquide sont couramment employées afin de multiplier des bouts de chaînes et de créer ainsi des fonctions carboxyle et hydroxyle en surface (Figure 11). Il est possible d'obtenir de telles structures par une hydrolyse à l'interface solide-liquide (Marchand-Brynaert *et al.*, 1995; Mougenot *et al.*, 1996). La surface ainsi obtenue pourra être, soit oxydée avec du permanganate de potassium pour donner les fonctions carboxyles, soit réduite avec du borohydrure de sodium pour obtenir des fonctions hydroxyles (Boxus, 1996).

Bien que l'hydrolyse soit la méthode la plus utilisée, il existe néanmoins d'autres voies de modification chimique de la surface du PET telles que l'aminolyse et l'alcoolyse.

En effet, l'aminolyse a souvent été utilisée dans le but d'introduire des fonctions amine à la surface du PET (Mangovska *et al.*, 1996; Nissen *et al.*, 2001; Tadeusz *et al.*, 2001). Dans ce cas, il suffit de faire réagir des amines multifonctionnelles à longue chaîne, comme par exemple le Triéthylènetétramine (TETTA) ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$) sur la surface du PET. Jiang *et al.* ont récemment modifié la surface de PET par aminolyse dans le but d'y greffer des peptides RGD (Jiang *et al.*, 2006). Dans cette étude la surface a été traitée par un mélange d'éthylène diamine et d'éthanol afin d'introduire des fonctions $-\text{NH}_2$ en surface du polymère.

L'alcoolyse du PET est une autre méthode qui consiste en l'immersion du polymère dans une solution contenant, le plus souvent, du glycérol ou du diéthylène glycol afin d'obtenir une surface d'oligoesters diols (Franck Hubert, 1999).

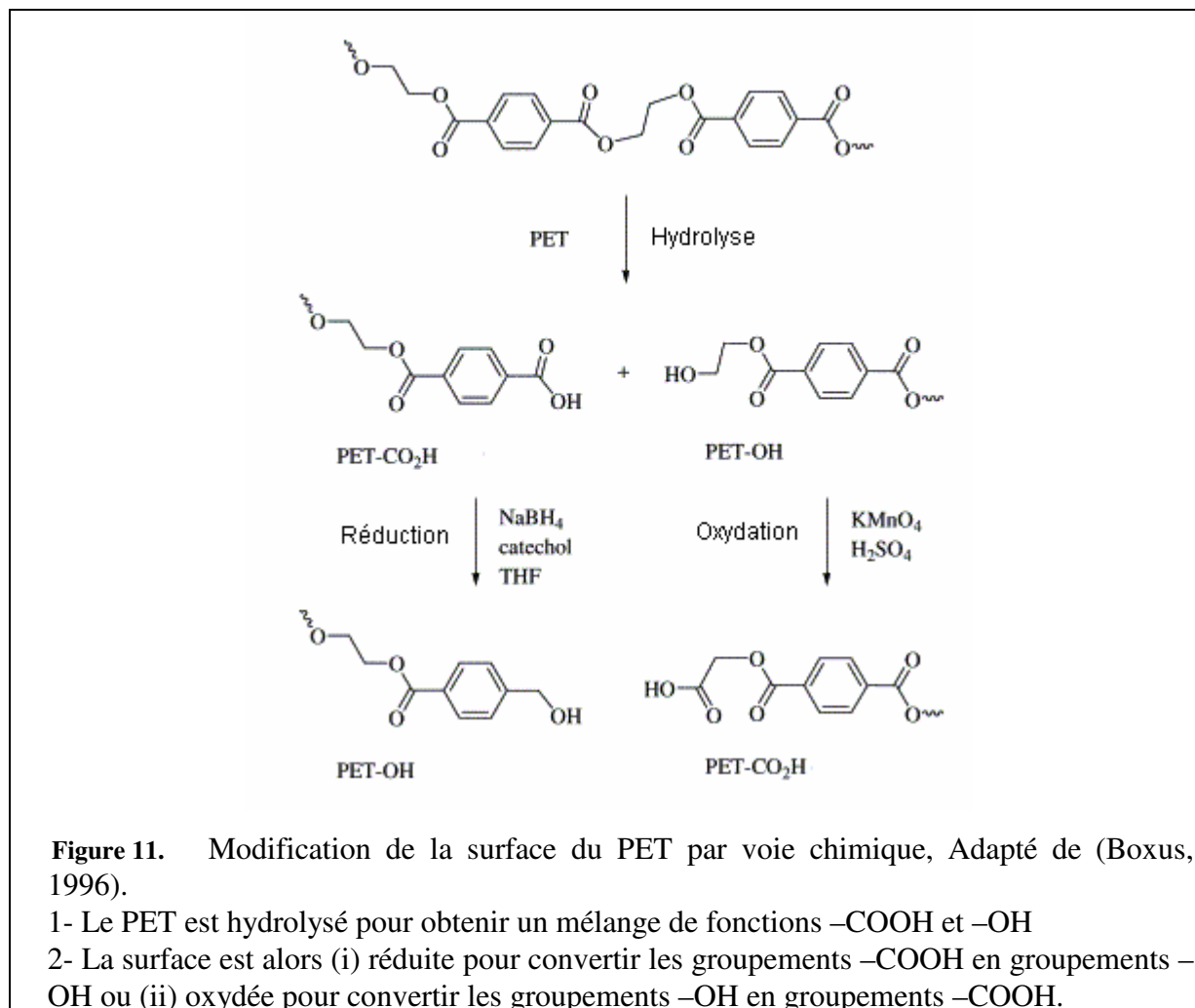


Figure 11. Modification de la surface du PET par voie chimique, Adapté de (Boxus, 1996).

- 1- Le PET est hydrolysé pour obtenir un mélange de fonctions –COOH et –OH
- 2- La surface est alors (i) réduite pour convertir les groupements –COOH en groupements –OH ou (ii) oxydée pour convertir les groupements –OH en groupements –COOH.

Même si la modification de surface par voie chimique comporte des inconvénients, tels que l'utilisation de grandes quantités de produits hautement corrosifs ainsi que des temps de réaction parfois longs, cette approche est couramment utilisée car elle ne nécessite pas d'équipement particulier et elle est donc à la portée de la plupart des laboratoires. Cette technique permet également de pénétrer à l'intérieur de structures poreuses tridimensionnelles, ce qui n'est pas le cas de toutes les méthodes de modifications de matériaux.

4- Dégradation enzymatique

Récemment, des recherches ont montré que les polymères synthétiques ou naturels pouvaient être modifiés en surface par l'utilisation d'enzymes telles que les protéases, les lipases ou les nitrilases (Heumann *et al.*, 2006). En effet, les traitements enzymatiques permettent de fonctionnaliser la surface des polymères sans avoir recours à des produits chimiques. Dans le cas du PET, les recherches se portent sur l'utilisation de polyestérases,

telles que les estérases, les cutinases ou les lipases, capables d'hydrolyser les chaînes polymériques et d'exacerber les groupements $-COOH$ et $-OH$ de la même façon que lors d'une hydrolyse chimique (Gubitz et Paulo, 2003). En 2004, Fischer-Colbrie *et al.* ont isolé un groupe d'enzymes afin de tester leur aptitude à dégrader le PET (Fischer-Colbrie *et al.*, 2004). Afin de qualifier précisément les réactions induites par les enzymes ils ont synthétisé un polymère modèle, le bis(benzoyloxyethyl)terephthalate. Ce polymère possède les mêmes propriétés de dégradation que le PET mais présente l'avantage de libérer des produits d'hydrolyse facilement caractérisables. Toutes les enzymes testées ont révélé être capable d'hydrolyser le polymère et donc de modifier ses propriétés de surface telles que le caractère hydrophile. A l'heure actuelle, de nombreuses études sont en cours pour trouver de nouvelles enzymes capables d'hydrolyser et de modifier la surface du PET, cependant cette technique est encore à l'étude et il n'existe pour le moment que peu d'applications (Mueller, 2006).

5- Traitement plasma

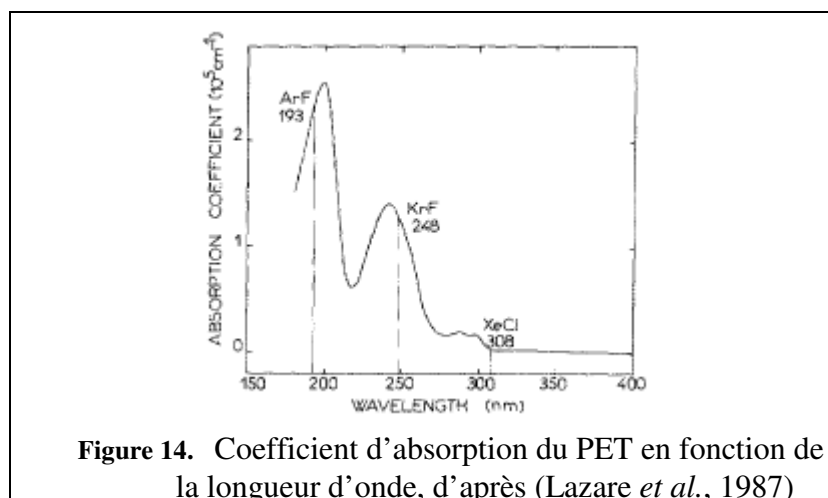
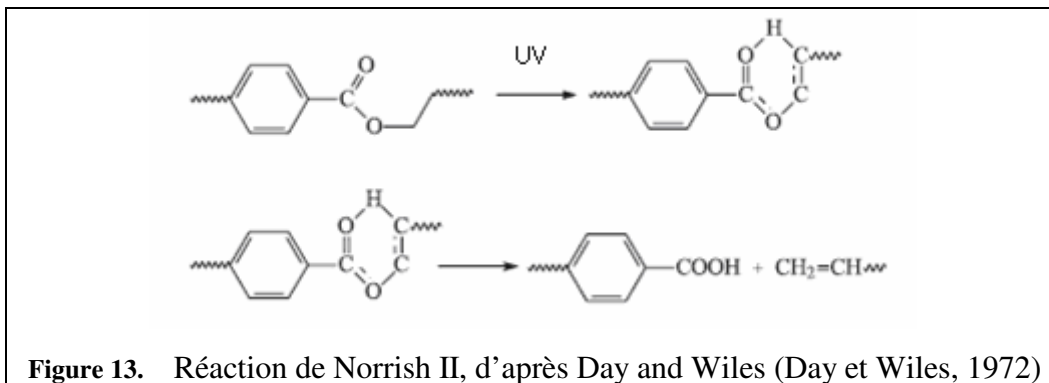
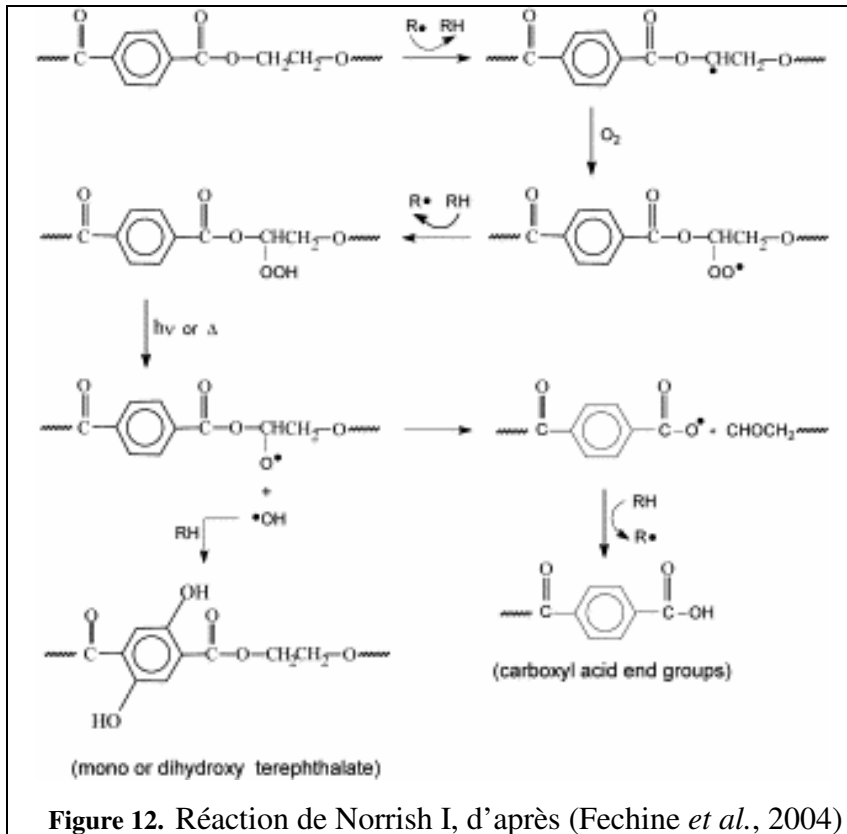
Le traitement plasma est, à l'heure actuelle, une des techniques les plus utilisées pour la modification de surface des polymères, et en particulier du PET. En effet, le bombardement de la surface des polymères par les espèces énergétiques créées au sein du plasma conduit à la rupture des liaisons covalentes et à la formation de radicaux libres. Ces derniers réagissent avec les espèces actives du plasma d'où il résulte à la surface des matériaux la formation de groupements chimiques fonctionnels dépendant de la nature de la phase gazeuse. Par exemple, les plasmas oxygénés (O_2 , CO_2 , H_2O ...) donnent naissance à la formation de groupements fonctionnels oxygénés (hydroxyle, carbonyle, carboxyle, peroxyde, hydroperoxyde, carbonate ...) alors que les plasmas azotés (N_2 , NH_3 ...) donnent lieu à la formation de groupements hydrophiles, en particulier de groupements amine ($-NH$, $-NH_2$; cas des plasmas NH_3) voire de groupements amide ($-N-C=O$). Les plasmas de gaz rares (He, Ne, Ar ...) sont également utilisés pour réaliser l'ablation de la surface des polymères et y créer des radicaux libres. La surface ainsi obtenue sert le plus souvent à l'immobilisation et à la polymérisation de monomères tel que l'acide acrylique. Bisson *et al.* ont utilisé la technique de polymérisation-greffage pour immobiliser du collagène en surface de PET (Bisson *et al.*, 2002). Leur traitement a été réalisé en 3 étapes. Premièrement, la surface du PET a été activée par le traitement plasma sous argon. Immédiatement après le traitement, la chambre a été vidée de tout l'oxygène qu'elle contenait et maintenue à pression atmosphérique afin de créer des fonctions hydroperoxyde à la surface du PET. Enfin, l'acide acrylique a été introduit dans la

chambre afin d'être greffé et polymérisé à la surface du PET. Les sites réactifs de l'acide acrylique ont finalement été utilisés pour le greffage covalent de collagène à la surface du PET. De la même manière, Wang *et al.* ont greffé des chaînes de PEG à la surface de PET modifié par plasma dans le but de réaliser des implants hémocompatibles (Wang *et al.*, 2005). Lopez *et al.* ont réalisé le greffage de peptides RGD sur un revêtement stable d'acide acrylique déposé en surface de PET par traitement plasma (Lopez *et al.*, 2005). Dans ce cas, le traitement a été réalisé dans des vapeurs d'acide acrylique afin de réaliser un dépôt homogène à la surface du matériau.

Cependant le traitement plasma présente quelques inconvénients. En effet, le grand nombre de réglages (durée du traitement, température, puissance, composition du gaz, débit, pression, distance entre la source et le matériau...) rend la reproductibilité d'un laboratoire à l'autre difficile. De plus l'incorporation volontaire de monomères ou de gaz à l'intérieur de la chambre présente un risque de contamination élevé.

6- Traitement aux UV

Depuis quelques années de nombreuses études ont démontré que la photodégradation du PET était caractérisée par une scission de la chaîne de polymère, une diminution de la masse molaire, le relargage de CO₂ ou de CO mais également par la formation de groupements terminaux -COOH à sa surface (Fechine *et al.*, 2004). La formation de ces groupements COOH est due aux réactions de photolyse (réactions de Norrish I et II) (Figures 12 et 13). Cependant, l'irradiation UV amène à de nombreux produits réactionnels et peut, selon la longueur d'onde (Figure 14) et la durée d'irradiation, modifier le PET sur des profondeurs variables. Cette méthode n'est donc pas, à notre connaissance, couramment employée pour introduire des groupements réactionnels à la surface du PET.



(b) Techniques de greffage des peptides

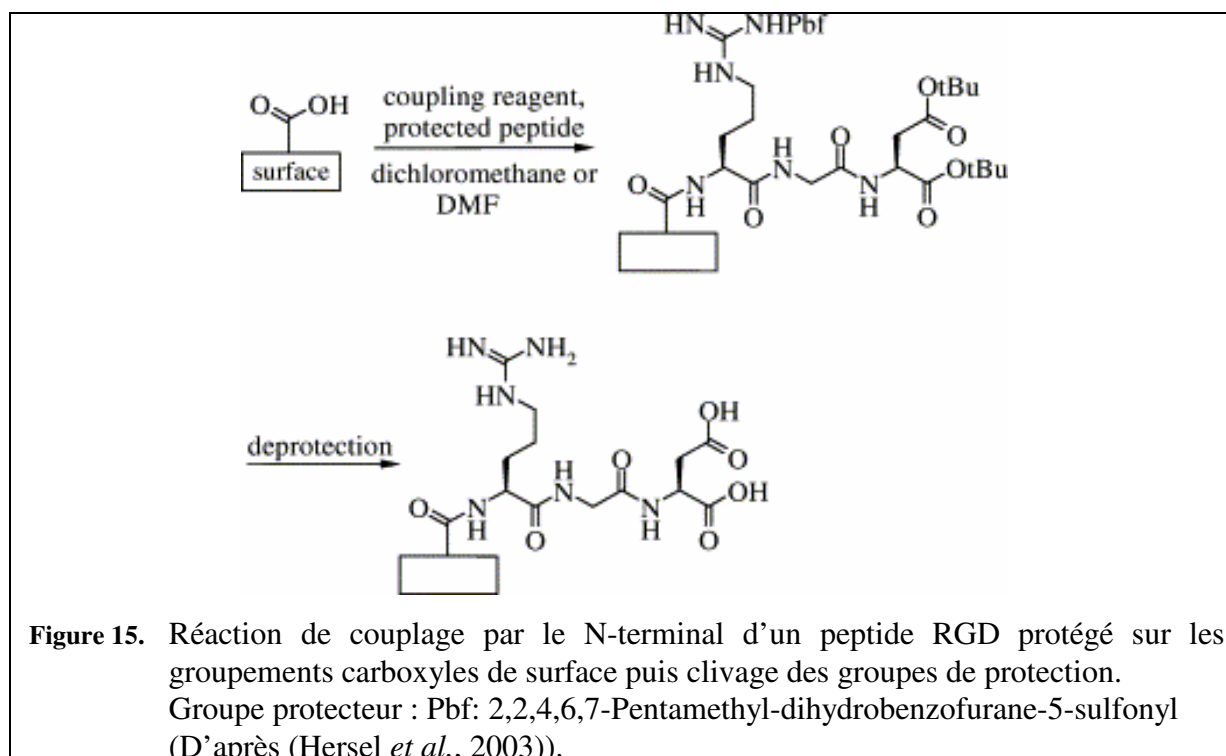
Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les peptides RGD ont besoin, pour assurer au mieux l'adhésion cellulaire, d'être liés au matériau de façon stable. C'est la raison pour laquelle dans la plupart des cas les peptides RGD sont liés de façon covalente aux polymères par l'établissement d'une liaison amide. Cette liaison est habituellement obtenue en faisant réagir un acide carboxylique activé à la surface du polymère avec le groupement N-terminal nucléophile du peptide. Les groupements acides carboxyliques peuvent être activés en utilisant un agent de couplage comme, par exemple, le 1-éthyl-3(3-diméthylaminopropyl)-carbo-diimide (EDC), le dicyclohexyl-carbodiimide (DCC) ou le carbonyl diimidazole (CDI).

Cependant cette méthode de couplage peut engendrer deux problèmes :

- Premièrement, les peptides comportent plusieurs groupes fonctionnels réactifs (Figure 6), les groupements carboxyles sur le C-terminal ainsi que sur les chaînes latérales de l'acide aspartique, le groupement NH₂ terminal et le groupement nucléophile guanidine de l'arginine. Donc, suivant les conditions de greffage (solvant, pH...), la liaison peptidique à la surface des matériaux peut se réaliser par le biais des différentes fonctions –COOH et –NH₂, présentant des réactivités différentes, ce qui peut entraîner une modification de la conformation du peptide voire une dénaturation.
- Deuxièmement, les groupements carboxyles activés et l'agent de couplage peuvent rapidement être neutralisés par hydrolyse.

1- Peptides protégés

Une des possibilités pour contrer ces problèmes est de bloquer les chaînes latérales réactives des acides aminés avec des groupements protecteurs et de travailler avec des solvants organiques tels que l'acétone, le DMF ou le dichlorométhane (Boxus, 1996; Lin *et al.*, 1994; Quirk *et al.*, 2001) (Figure 15). Cependant l'inconvénient majeur de cette voie de couplage est le besoin de déprotection des peptides après le greffage. Même en utilisant un groupement protecteur labile, l'étape de déprotection peut durer jusqu'à 3h.



2- Peptides non protégés

La deuxième voie de couplage peptidique consiste à greffer des peptides non protégés en solution aqueuse par le biais d'une réaction en deux étapes.

Premièrement les groupements carboxyles de la surface sont activés sous forme d'esters actifs, par exemple en N-hydroxysuccinimide (NHS), moins sujets à l'hydrolyse (Figure 16-A). Dans un deuxième temps, les peptides sont alors couplés à la surface dans de l'eau. Le plus souvent les esters actifs en surface de polymères sont générés en utilisant simultanément un agent de couplage (EDC, DCC) et du NHS (Jo *et al.*, 2000). Généralement le couplage du NHS s'effectue à température ambiante dans un tampon phosphate à pH 8-9 (Morpurgo *et al.*, 1999), cependant l'utilisation de températures et de pH plus faibles permet d'augmenter le rendement réactionnel (Dai *et al.*, 1994). Cette modification en deux étapes ne demande pas de protéger les peptides car dans ce cas le groupement carboxylique de l'acide aspartique n'est pas activé et, de part la protonation dans l'eau, le caractère nucléophile des chaînes latérales de l'arginine est supprimé.

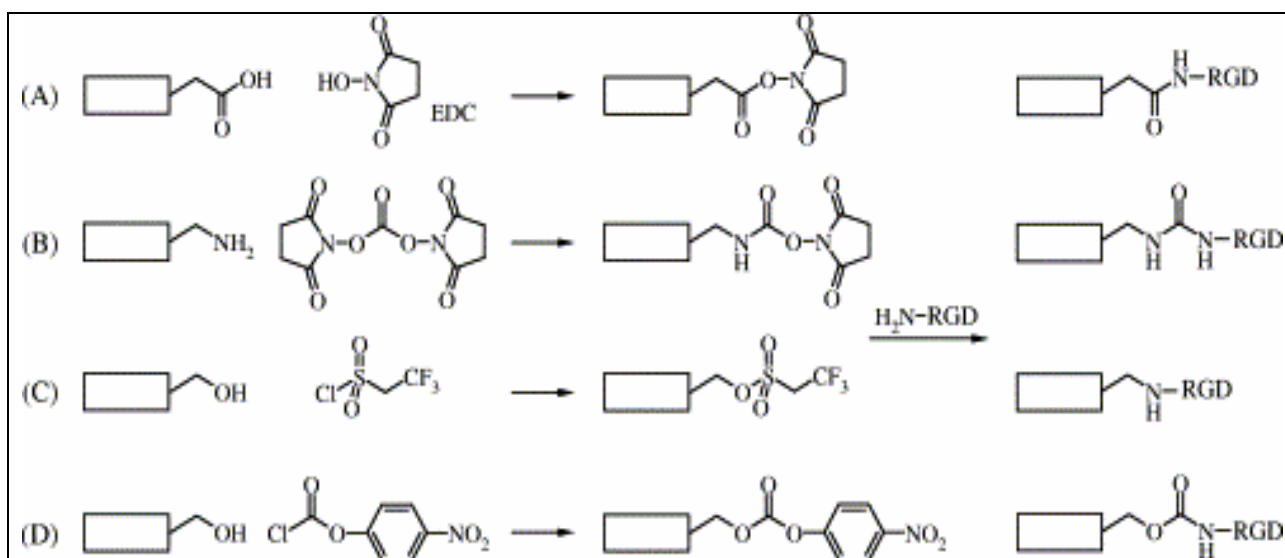


Figure 16. Les peptides RGD par le biais de leur fonction N-terminale réagissent avec les différents groupements présents en surface du matériau : (A) groupements carboxyliques préactivés avec un carbodiimide et NHS pour générer un ester actif, (B) groupements amines préactivés avec DSC (N,N'-disuccinimidyl carbonate), (C) groupements hydroxyles préactivés pour former des trésylates, (D) groupements hydroxyles préactivés pour former du p-nitrophényl carbonate (D'après (Hersel *et al.*, 2003)).

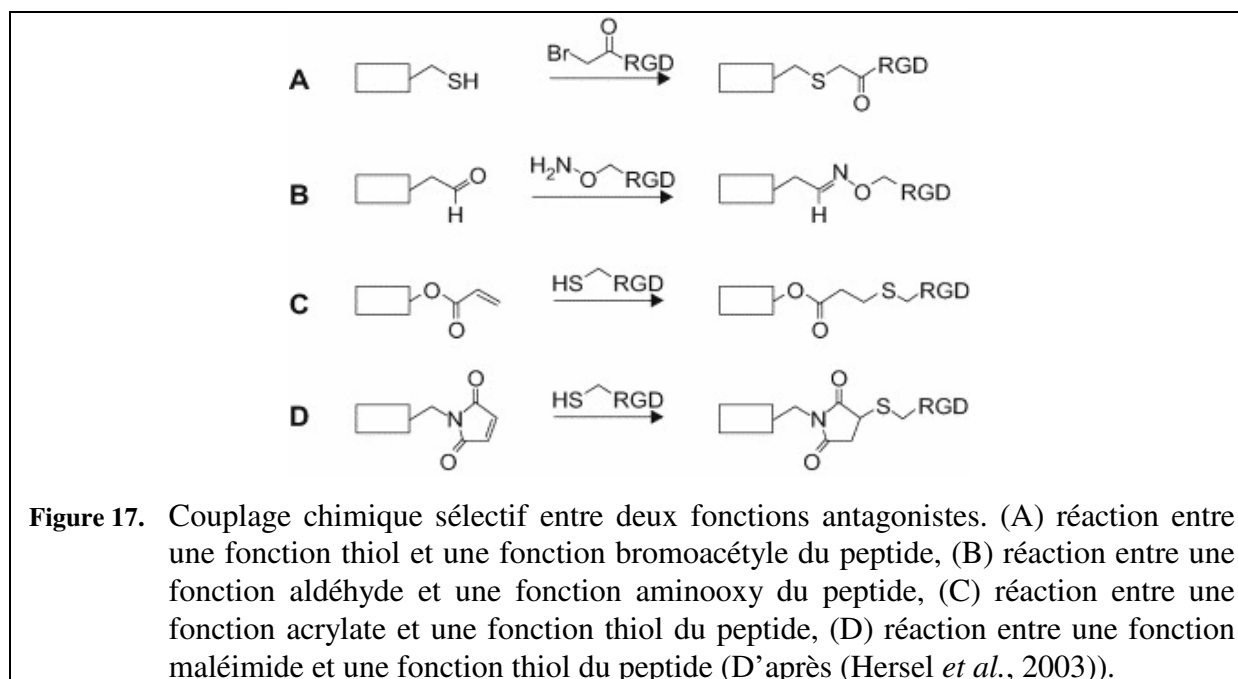
Même si le greffage sur les fonctions carboxyliques est le plus utilisé, il est par ailleurs possible de réaliser ce couplage en deux étapes sur des fonctions amines ou hydroxyles.

Les groupements amines peuvent ainsi être activés par l'utilisation de DSC (N,N'-disuccinimidyl carbonate) avant le couplage aux RGD (Figure 16-B) (Morpurgo *et al.*, 1999). Les surfaces contenant des groupements hydroxyles peuvent être préactivées de la même manière par du chlorure de trésyle (Figure 16-C) (Massia et Hubbell, 1991). Une autre voie d'activation est l'utilisation de DSC ou de p-nitrophenyl chloroformate (Figure 16-D) (Jo *et al.*, 2001). Lors du couplage de peptide, du p-nitrophenol se détache de la surface et peut être détecté par absorption UV. Cependant, le p-nitrophenol est très toxique, la surface doit alors en être totalement dépourvue avant toute utilisation biologique.

L'hexaméthylène diisocyanate est également utilisé pour coupler les groupements amines ou hydroxyles d'une surface et les peptides en formant une liaison uréthane (Kobayashi et Ikada, 1991). Une dernière voie de fixation est le couplage des RGD sur une surface par le biais de ponts disulfures. Cependant ce type de liaison n'est que rarement utilisée à cause de sa faible stabilité dans le temps (Neff *et al.*, 1999; Ruoslahti, 1996).

3- Couplage chimique sélectif

Depuis une dizaine d'années, il existe une nouvelle approche de greffage peptidique, il s'agit du couplage chimique sélectif entre deux fonctions antagonistes (Figure 16). Cette méthode permet la formation de liaisons stables sans utilisation d'un agent de couplage et sans interférer avec les autres groupements fonctionnels (Tam *et al.*, 1999; Wahl et Mutter, 1996). Ces réactions sont de plus en plus utilisées car elles peuvent être réalisées en conditions ambiantes et donnent de très bons taux de rendements.

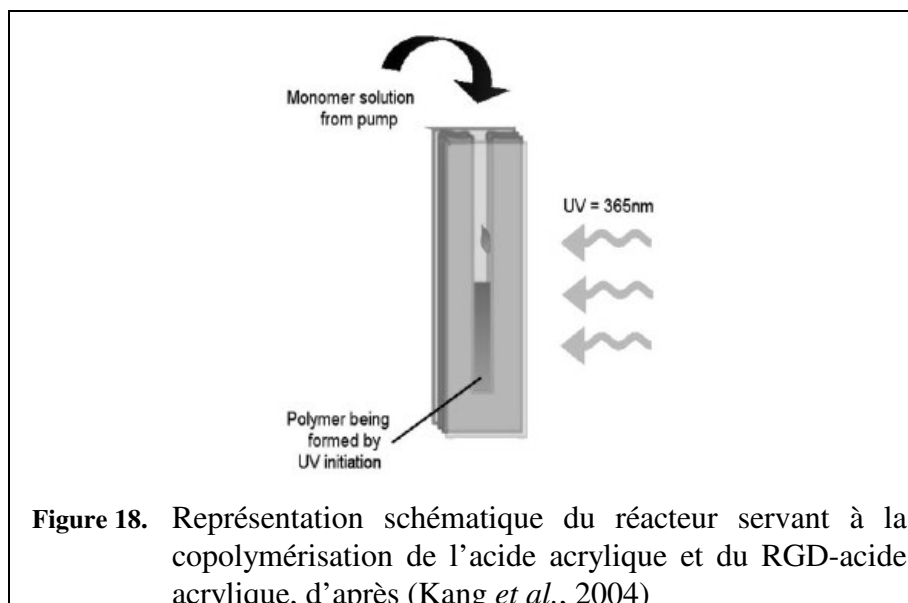


La figure 17 présente quelques exemples de greffage de peptides RGD par couplage chimique sélectif. Par exemple, un peptide cyclique contenant une fonction bromoacétyle peut être immobilisé sur une surface présentant des groupements thiols (Figure 17-A) (Ivanov *et al.*, 1995). De la même manière, un peptide terminé par un groupement aminooxy peut réagir sur des fonctions aldéhydes (Figure 17-B) (Kantlehner *et al.*, 2001).

De nombreuses études se sont portées sur le couplage de peptides contenant des fonctions thiols, par exemple dues à la présence de cystéine. Deux techniques de couplage ont essentiellement été développées. Les fonctions thiols du peptide peuvent réagir sur une surface contenant des esters acryliques ou des acrylamides par une addition de Michael (Figure 17-C) (Elbert et Hubbell, 2001). Il est également possible de coupler ces thiols sur des groupements maléimides (Figure 17-D). De cette manière, Lateef *et al.* ont greffé des peptides RGD sur des surfaces préalablement activées avec du Sulfo-SMCC (sulfo-succinimidyl 4-(N-maleinimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) (Lateef *et al.*, 2002).

G) Importance de la densité de peptides RGD en surface

Il est à présent établi que le greffage de peptides RGD en surface de matériaux permet d'augmenter l'adhésion cellulaire. Néanmoins, la quantité de cellules attachées est clairement reliée à la densité de peptides RGD distribuée en surface. L'attachement cellulaire montre une croissance sigmoïde en fonction de la densité de peptides RGD immobilisés en surface (Kantlehner *et al.*, 2001), cela semble donc indiquer qu'il existe une densité minimale critique pour la réponse cellulaire. C'est la raison pour laquelle, depuis la découverte du peptide RGD, de nombreux chercheurs tentent d'évaluer cette densité minimale nécessaire pour induire non seulement l'attachement cellulaire mais également l'étalement et la formation de contacts focaux. Les premiers résultats ont été obtenus par Massia et Hubbell en 1991 et indiquent qu'une densité de $1\text{fmol}/\text{cm}^2$ est nécessaire à l'attachement des fibroblastes mais que l'étalement et la formation de contacts focaux n'intervient qu'à partir d'une densité de $10\text{fmol}/\text{cm}^2$ (Hubbell *et al.*, 1991). Cette densité correspond alors à un espacement de 440nm entre les peptides RGD. Des études complémentaires ont également été réalisées, notamment à propos de l'effet de la densité de peptides RGD sur la minéralisation des ostéoblastes. Rezania et Healy ont évalué une densité minimale ($0,62\text{pmol}/\text{cm}^2$) responsable du déclenchement de la calcification (Rezania et Healy, 2000). Kang *et al.* ont réalisé des matériaux contenant des gradients de densités de peptides RGD. Les matériaux ont été obtenus par la copolymérisation sous UV d'une solution présentant des taux variables et contrôlés d'acide acrylique et de RGD-acide acrylique (Figure 18). Ils ont alors pu observer l'alignement de fibroblastes sur les surfaces greffés en fonction de la densité de peptides RGD immobilisés (Kang *et al.*, 2004).



Cependant, une comparaison de l'influence de la densité de peptides RGD en surface dans différents systèmes d'adhésion cellulaire ne peut être effectuée que lorsque tous les autres effets qui contribuent à l'adhésion cellulaire sont exclus. Cela n'est pas le cas dans tous les exemples présentés à cause de l'utilisation de différentes lignées cellulaires, différents peptides qui présentent des affinités de liaison avec les intégrines variables, différentes stratégies de fonctionnalisation de surface mais également différentes méthodes pour l'évaluation de la densité de peptides immobilisés à la surface des biomatériaux. C'est la raison pour laquelle il n'existe à ce jour aucun consensus concernant la densité de peptides RGD « idéale » requise pour stimuler les fonctions cellulaires.

H) Quels sont les outils qui permettent de quantifier la densité de peptides immobilisés en surface d'un matériau ?

L'analyse des surfaces modifiées par les peptides RGD est essentielle car elle permet de répondre à deux questions essentielles : les peptides sont-ils bien immobilisés à la surface du matériau ? Si oui, à quelle densité surfacique ? En effet, la quantification des peptides est non seulement nécessaire pour optimiser les réactions de couplage des RGD mais également pour comprendre l'influence de la densité peptidique sur l'adhésion cellulaire. De nombreuses techniques ont été utilisées et adaptées dans le but de quantifier la densité de biomolécules greffées en surface de matériaux. Nous allons essayer dans ce chapitre de lister les différentes techniques qui ont pu être utilisées en présentant leurs avantages et leurs inconvénients. Comme nous le verrons, une évaluation quantitative précise de la densité de biomolécules immobilisées en surface de biomatériaux reste encore aujourd'hui un défi à relever.

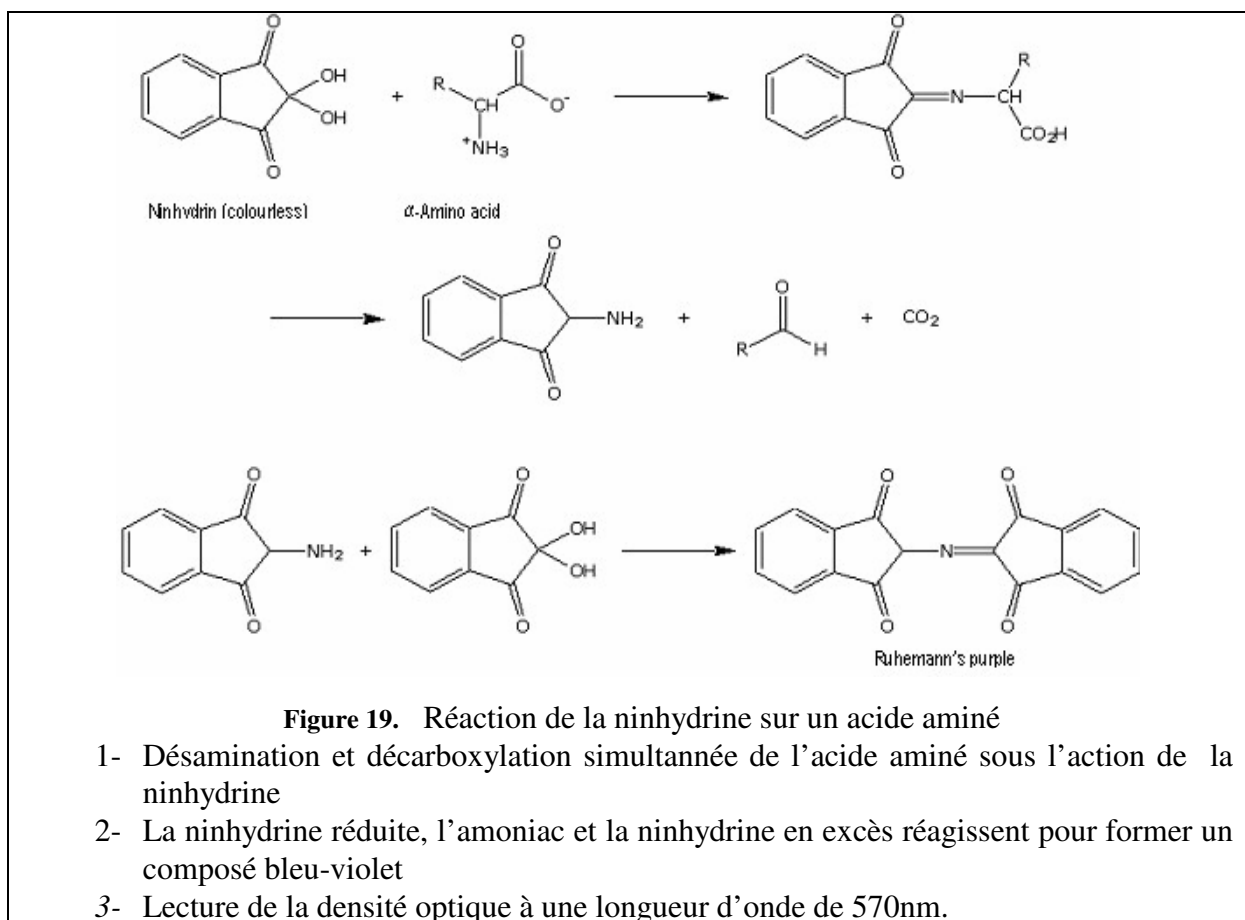
(1) Dosage des acides aminés par des techniques colorimétriques

(a) Dosage direct

La technique la plus utilisée pour le dosage direct des acides aminés est l'Analyse des Acides Aminés (AAA) (Figure 19). Cette technique peut être utilisée pour le dosage de peptides immobilisés en surface de matériaux, dans ce cas une hydrolyse doit préalablement être réalisée afin de décrocher tous les peptides de la surface. Les résidus d'hydrolyse ainsi obtenus peuvent être quantifiés par un analyseur d'acides aminés combinant une chromatographie sur colonne échangeuse d'ions et une réaction à la ninhydrine (Ho *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1994; Neff *et al.*, 1998). Une autre alternative est de faire

réagir les hydrolysats avec de la ninhydrine et de comparer l'absorption de la solution obtenue à celle d'une gamme étalon (Yamaoka *et al.*, 1999).

☞ Cette méthode de dosage donne donc rapidement accès à la quantification des acides aminés en solution. Cependant dans le cas de peptides greffés en surface de biomatériaux elle nécessite le décrochage des biomolécules par hydrolyse de la surface. Cela entraîne deux inconvénients : (i) la surface doit être analysée après l'hydrolyse afin de vérifier que tous les peptides ont bien été enlevés de la surface, (ii) la méthode est destructive ce qui rend toute analyse subséquente impossible.



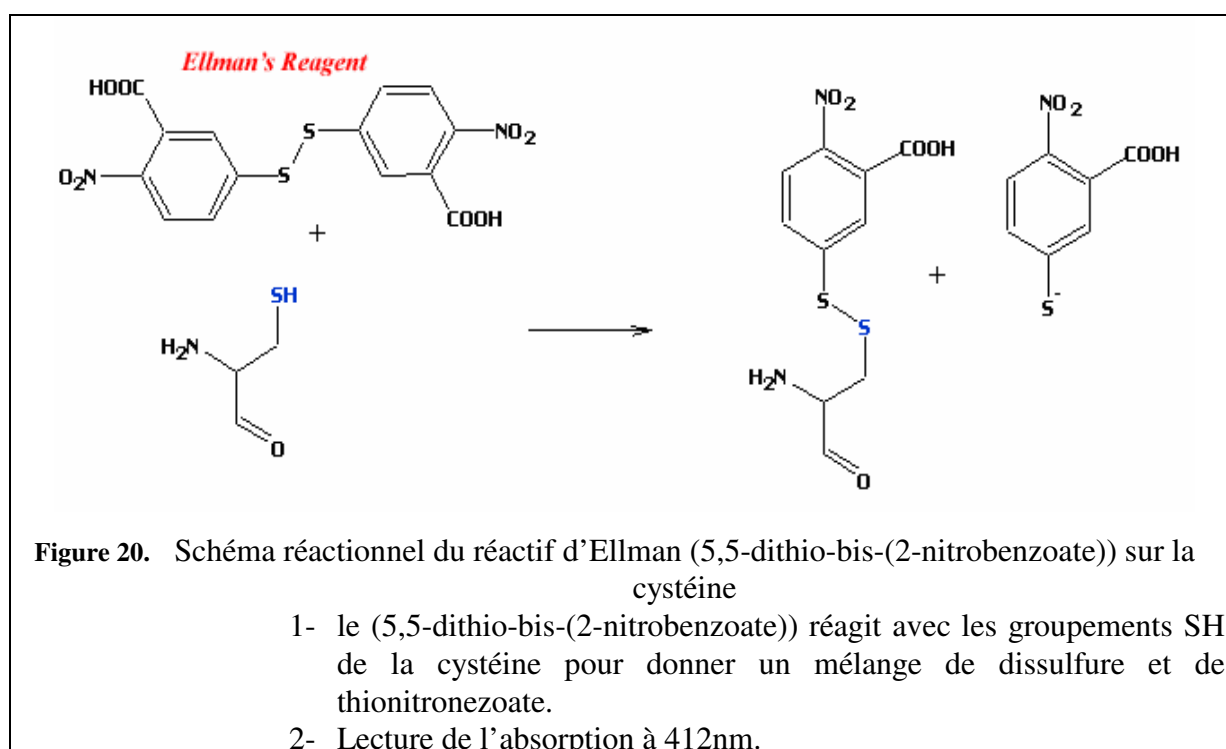
Il existe d'autres techniques de dosage direct des acides aminés pouvant être utilisées pour la quantification des peptides RGD. La réaction de Sakaguchi (Parniak *et al.*, 1983), spécifique de l'arginine, et le test BCA (acide bicinchronique) (Banerjee *et al.*, 2000), spécifique des amines primaires et secondaires, sont les plus utilisées. Cependant ces techniques demandent, pour être quantitatives, une calibration rigoureuse, ce qui n'est pas possible dans le cas de peptides greffés en surface de matériaux. Par exemple, Jiang *et al.* ont

utilisé la technique BCA pour quantifier la densité de peptides RGD immobilisés en surface de matériaux (Jiang *et al.*, 2006; Kakabakos *et al.*, 1994). Les peptides, une fois immobilisés sur le substrat, ont subi un traitement visant à convertir toutes les fonctions amines en groupements sulfhydryles. Ces derniers ont alors été quantifiés par la méthode BCA en utilisant une gamme élaborée à partir de solutions de cystéine de concentrations contrôlées. L'orientation, l'encombrement stérique et la réactivité des fonctions chimiques des peptides ne sont pas rigoureusement les mêmes dans le cas d'un peptide en solution et dans le cas d'un peptide greffé sur un matériau ce qui entraîne des accessibilités différentes.

↳ Une gamme de cystéine en solution ne peut donc pas être utilisée de façon rigoureuse pour la quantification de peptides greffés sur un matériau.

(b) Dosage indirect

Les techniques de dosage des acides aminés peuvent également être utilisées pour des dosages indirects. Dans ce cas, on ne dose plus les peptides greffés en surface d'un matériau mais les peptides en solution n'ayant pas réagi. Toutes ces techniques utilisent une réaction colorimétrique couplée à une détection UV/HPLC (High Precision Liquid Chromatography). Par exemple, dans le cas de peptides contenant de la cystéine, il est possible de doser les fonctions thiols avec le réactif d'Ellman (Figure 20) (Elbert et Hubbell, 2001).



☞ *Cependant, les techniques de dosage indirect des acides aminés ne sont que peu utilisées pour la quantification de peptides en surface de matériaux car les résultats obtenus ont, de part les limites de résolution des méthodes colorimétriques, une significativité réduite.*

(2) Dosage des acides aminés par l'utilisation de radioéléments

L'utilisation des radioéléments est très utilisée pour l'évaluation de la densité de peptides immobilisés en surface de biomatériaux, et ce, à cause de sa haute sensibilité.

(a) Iodination radioactive

L'iodination radioactive de peptides couplée à une détection au compteur γ est très utilisée car elle permet de détecter des densités de peptide de l'ordre de la fmoles (Brandley et Schnaar, 1989). Généralement, l'iode marquée (^{125}I) est introduite dans la chaîne peptidique par une iodination oxydative de la tyrosine (Salacinski *et al.*, 1981). Après la purification du peptide, une quantité de radioactivité peut être corrélée à une quantité de peptides préalablement déterminée par spectroscopie (Drumheller et Hubbell, 1994). Dans certains cas les peptides marqués sont dilués dans une solution de peptides non marqués avant l'immobilisation en surface du matériau (Neff *et al.*, 1998). Massia et Hubbell ont employé cette technique dans l'étude statuant que la densité minimale de peptides GYRGD nécessaire pour stimuler l'adhésion cellulaire était de $1\text{fmol}/\text{cm}^2$ (Massia et Hubbell, 1991).

☞ *Cependant, la mesure de l'activité par compteur γ n'amène qu'à des valeurs en coup par minute (CPM) et ne donne pas accès à la répartition des peptides en surface. De plus, cette technique ne permet pas, de la même manière que la méthode BCA, la réalisation d'une gamme précise ce qui rend une quantification rigoureuse impossible.*

(b) Compteur à scintillation

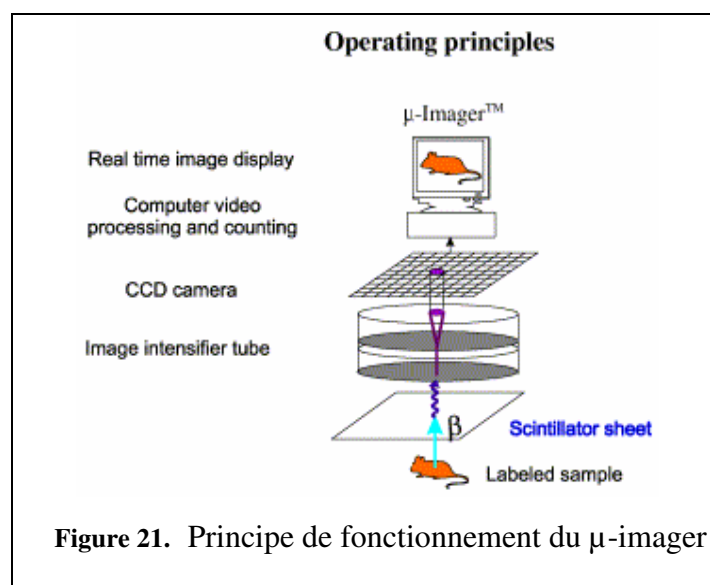
L'activité de peptides radiomarqués par du ^3H ou du ^{35}S peut également être évaluée par compteur à scintillation. Par exemple, Xiao *et al.* ont greffé un peptide RGDC contenant de la cystéine marquée au ^{35}S afin de quantifier la densité peptidique à l'aide d'un compteur à scintillation (Xiao *et al.*, 1997). De même, Marchand-Brynaert *et al.* ont greffé de la lysine marquée (^3H -Lysine) en surface de PET et ont quantifié la densité par compteur à scintillation (Marchand-Brynaert *et al.*, 1995).

↳ Même si cette technique permet une quantification précise de la densité de peptides, elle ne donne pas accès à la distribution du greffage en surface des matériaux. Par ailleurs, l'évaluation d'une radioactivité par le biais d'un compteur à scintillation requiert l'analyse d'une solution homogène dans le scintillant. Or dans le cas d'un greffage de peptides, le matériau est introduit dans le liquide à scintillation sans être solubilisé au préalable et ne donne donc pas une solution homogène.

(c) Imagerie bêta haute résolution

Récemment, une technique utilisant des radioéléments a été développée pour quantifier les peptides en surface de matériaux, le μ -imager. Il s'agit d'un dispositif commercialisé par la société BIOSPACE[®] dont le principe est basé sur la détection de la radioactivité β avec localisation bidimensionnelle des particules émises, ce qui permet une détection directe avec imagerie quantitative de la distribution de radioactivité (Barthe *et al.*, 2004; Barthe *et al.*, 1999; Crumeyrolle-Arias *et al.*, 1996; Guillemot *et al.*, 2007).

Le principe de fonctionnement de ce dispositif est représenté sur la figure 21.



Des photons issus de l'interaction entre les électrons émis par l'échantillon et un papier scintillant sont collectés par un capteur CCD hautement amplifié. Le centre de chaque distribution de photons est calculé, permettant une cartographie de l'activité de l'échantillon. Les erreurs dues à la trajectoire des particules sont corrigées par l'étude de la morphologie des spots lumineux. La résolution varie en fonction du radioélément utilisé. Par exemple, une résolution de 15 μm pourra être obtenue lors de l'utilisation du ^3H , alors qu'elle ne sera que de 20 μm avec le ^{35}S et le ^{14}C .

Cette méthode présente l'avantage d'une quantification directe, une linéarité des réponses, une grande amplitude de résultats et un bruit réduit. De plus cette technique est non destructive, elle permet donc d'étudier par exemple la stabilité du greffage au cours du temps en immergeant le matériau dans une solution susceptible d'engendrer la rupture des liaisons engagées.

A l'heure actuelle, l'utilisation de l'imagerie bêta a permis, dans quelques études, d'évaluer la densité et d'étudier la stabilité de peptides immobilisés en surface de biomatériaux. Par exemple, Porté-Durrieu *et al.* ont greffé de la ³⁵S-Cystéine sur du titane fonctionnalisé afin de mimer le greffage de peptide RGDC. La densité de peptide greffée a ainsi pu être évaluée par imagerie bêta à 6 pmol/mm² (Porte-Durrieu *et al.*, 2004). Des études similaires ont également été réalisées sur de nombreux matériaux tels que l'hydroxyapatite (Durrieu *et al.*, 2004) ou la cellulose (Bartouilh de Taillac *et al.*, 2004).

(3) *Test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)*

Le test ELISA peut être utilisé pour quantifier la densité de peptides RGD immobilisés sur une surface par le biais d'anticorps anti-cyclo(DfKRG) développés par Merck (Irvine *et al.*, 2001; Kantlehner *et al.*, 2001).

☞ *Cependant, cette technique n'amène, de la même manière que le test BCA, qu'une évaluation semi-quantitative de la densité de peptides. En effet, l'obtention de gammes parfaitement calibrées dans le cadre de peptides immobilisés en surface de matériaux reste, ce jour, quasiment impossible. De plus la disponibilité commerciale d'anticorps anti-RGD reste faible.*

(4) *Spectroscopie à photoélectrons X (XPS)*

La spectroscopie de photoélectrons X a été utilisée pour étudier la composition de surface de matériaux fonctionnalisés par le greffage de peptides RGD. Des études ont tenté de valider le greffage peptidique en mettant en évidence l'augmentation de l'élément azote et des liaisons C=O. Cependant, la couche de peptides RGD greffée en surface d'un matériau excède rarement quelques nanomètres, elle est donc très fine devant la profondeur sondée durant l'analyse XPS (quelques dizaines de nm). Le signal obtenu peut alors être masqué par le signal du substrat. De plus, dans le cas des polymères, il est très difficile, de part la

composition initiale et les pollutions de surface, de réaliser une étude quantitative de la couche greffée.

Une solution consiste à introduire des éléments sur le peptide, tels du fluor ou de l'iode, afin de permettre une quantification. Biltresse *et al.* ont synthétisé des mimes peptidiques en y incorporant du fluor puis les ont greffés en surface de membranes de PET (Biltresse *et al.*, 2005). Ils ont ensuite quantifié la densité de peptides immobilisés sur le polymère par analyse XPS en se basant sur le ratio F/C.

✧ *L'XPS est un outil puissant permettant de quantifier des pourcentages atomiques présents en surface ainsi que les liaisons chimiques établies. Cependant, les résultats portant sur la quantification de peptides greffés en surface de biomatériaux sont souvent à prendre à caution compte tenu (i) des pollutions inévitables toujours présentes en surface de matériaux et (ii) des profondeurs sondées souvent supérieures à celle de la couche greffée.*

l) Importance de la distribution des peptides RGD en surface

Depuis de nombreuses années, plusieurs équipes de chercheurs à travers le monde ont réussi à mettre en évidence l'intérêt d'une densité peptidique contrôlée pour augmenter l'adhésion cellulaire et stimuler la formation de contacts focaux. A une échelle macroscopique, il est connu que pour adhérer sur une surface artificielle les cellules ont besoin d'une zone adhésive minimale. A l'échelle moléculaire les chercheurs commencent à s'intéresser à la manière dont l'arrangement spatial des peptides RGD sur une surface peut contribuer à l'amélioration des réponses cellulaires telles que l'adhésion, la croissance et la prolifération. En effet, la réponse cellulaire n'est pas seulement affectée par la densité de ligand mais également par la distribution et la présentation de ces ligands en surface du biomatériau.

En 2002, Maheshwari *et al.* (Maheshwari *et al.*, 2000) ont ainsi mis en évidence l'intérêt d'une agglomération des peptides RGD à l'échelle nanométrique pour favoriser le regroupement des intégrines et donc la formation de contacts focaux. En effet, son étude indique qu'à une même densité de peptides en surface les cellules forment plus de contacts focaux lorsque les peptides se présentent sous la forme d'agglomérats plutôt que sous une forme individuelle (Figure 22).

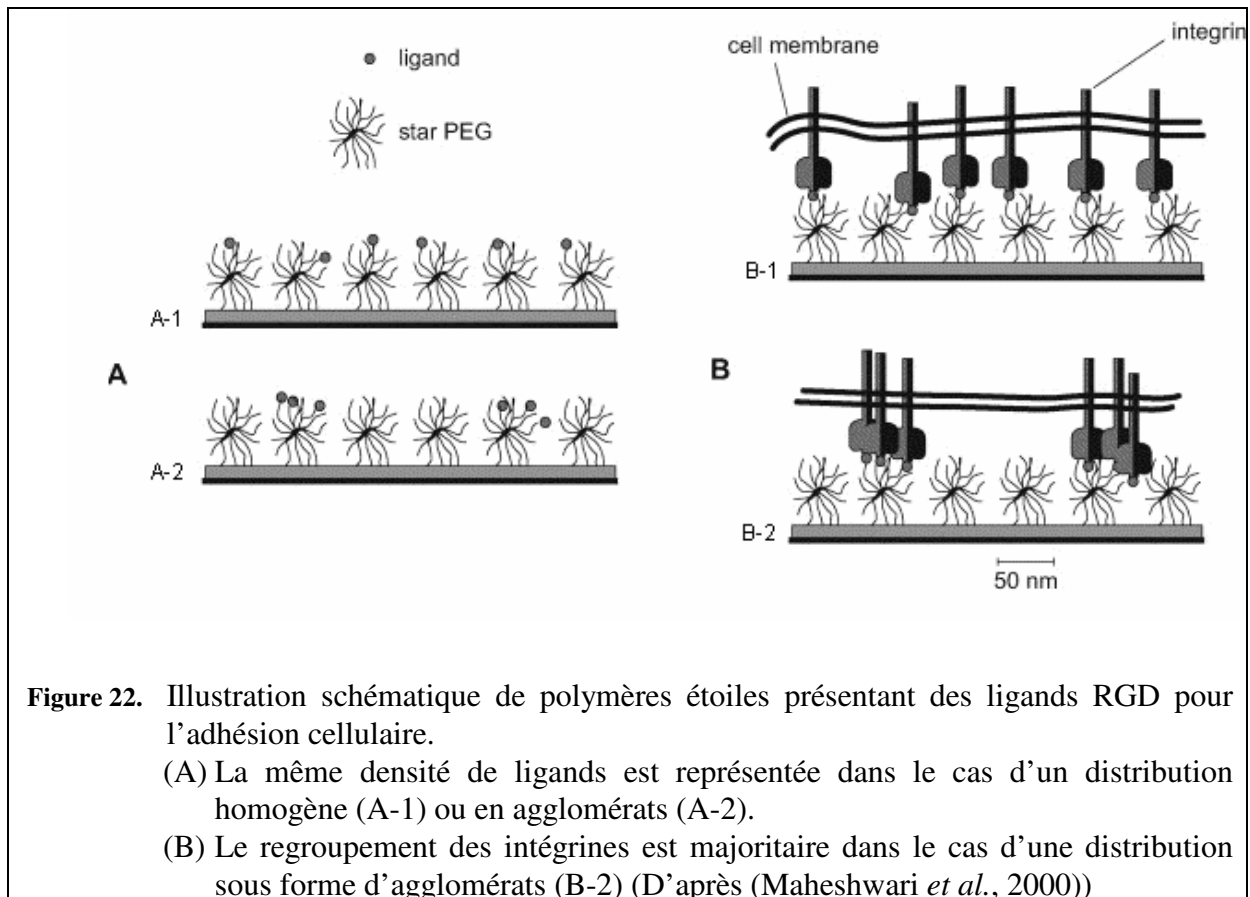


Figure 22. Illustration schématique de polymères étoiles présentant des ligands RGD pour l'adhésion cellulaire.
 (A) La même densité de ligands est représentée dans le cas d'un distribution homogène (A-1) ou en agglomérats (A-2).
 (B) Le regroupement des intégrines est majoritaire dans le cas d'une distribution sous forme d'agglomérats (B-2) (D'après (Maheshwari *et al.*, 2000))

Cette étude a par la suite été complétée par les travaux de Irvine *et al.* et de Koo *et al.* qui ont démontré, de manière expérimentale ou par des simulations théoriques, que la résistance des cellules soumises à des contraintes mécaniques était liée à la distribution des ligands RGD en surface du matériau (Irvine *et al.*, 2002; Irvine *et al.*, 2001). Dans leur étude, Koo *et al.* ont choisi de greffer des peptides GRGDSPK à la surface de copolymères sous forme de clusters composés de 1,7 peptides, 3,6 peptides ou 5,4 peptides (Koo *et al.*, 2002). Pour chaque type de cluster, 3 densités moyennes ont été réalisées variant entre 190 et 5270 RGD/ μm^2 . Des tests de détachement cellulaire ont alors été réalisés en comparant les matériaux fonctionnalisés par les RGD à des matériaux revêtus de fibronectine. Une augmentation de la force d'adhésion des cellules n'a été observée qu'avec les clusters de 3,6 et 5,4 RGD/cluster, et ce, quelque soit la densité peptidique moyenne. Néanmoins, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les densités moyennes les plus élevées. Ces résultats suggèrent que l'adhésion cellulaire est non seulement influencée par la densité surfacique de peptides mais également par leur distribution à la surface des matériaux.

Plus récemment, Cavalcanti-Adam *et al.* ont montré qu'un espacement de 58 nm entre les clusters de RGD augmentait l'adhésion et l'étalement des fibroblastes de rat (Cavalcanti-

Adam *et al.*, 2007). Dans cette étude, ils ont déposé des nano-plots d'or de 8 nm, correspondant à la taille d'une intégrine, sur une surface par lithographie colloïdale. Les espaces entre les plots d'or ont subi une passivation par dépôt de polyéthylène glycol afin d'éviter une adhésion cellulaire non spécifique et les plots ont été fonctionnalisés par auto-assemblage de peptide cyclo-(DfKRG)-thiol à leur surface. Pour un espacement de 108 nm entre les plots, les cellules présentent un retard d'étalement et des études morphologiques ont permis de conclure que leur adhésion n'était pas stable. En revanche, l'observation des contacts focaux montre que l'adhésion des cellules sur les plots espacés de 58 nm semble beaucoup plus stable.

Au regard de ces études, l'agglomération de peptides RGD en surface de matériaux à une échelle nanométrique semble donc être une approche intéressante pour augmenter la réponse cellulaire. Il en est de même pour l'organisation à l'échelle micrométrique. Kang *et al.* (Kang *et al.*, 2004) ont en effet montré que la taille des fibroblastes (aire de surface cellulaire) alignés sur des micro-domaines de peptides RGD était deux fois plus importante que dans le cas de surfaces homogènes contenant la même densité surfacique de peptides.

C'est la raison pour laquelle, depuis quelques années, les chercheurs s'intéressent aux techniques de micro- et nano-fabrications pour étudier le comportement des cellules *in vitro* sur des surfaces contrôlées. L'objectif commun est l'élaboration de surfaces comportant des motifs géométriquement contrôlés qui permettront de comprendre les processus d'attachement cellulaire.

IV. Micro- et nano-distribution de biomolécules en surface de matériaux

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'ingénierie tissulaire est une technologie émergente qui a pour but de réparer ou de régénérer les tissus endommagés en associant, par exemple, des biomatériaux avec des cellules. Le biomatériau joue alors le rôle d'échafaudage, conçu pour fournir un premier appui de l'adhésion cellulaire mais également un cadre structural permettant aux cellules de s'organiser et de s'assembler en un tissu fonctionnel. Afin d'améliorer au mieux l'adhésion et la croissance cellulaire, de nombreux chercheurs ont focalisé leurs études sur la modification et la fonctionnalisation de surface des biomatériaux. A ce jour, l'immobilisation de la séquence RGD en surface de biomatériaux est une des voies de fonctionnalisation les plus utilisées pour favoriser l'adhésion cellulaire.

Cependant, il n'existe actuellement aucun matériau pouvant être considéré comme « idéal » car les cellules cultivées *in vitro* sur les supports artificiels présentent souvent des phénotypes et des structures différentes de ceux exprimés en conditions *in vivo*. En effet, les cellules en conditions naturelles répondent, par le biais de la matrice extracellulaire, à une grande variété de signaux environnementaux. Ces signaux s'organisent à des échelles micro- et nanométriques et peuvent modifier les fonctions cellulaires ou la structure tissulaire. Afin de mieux contrôler les interactions entre les cellules et les matériaux, de nombreux chercheurs tentent d'élaborer des surfaces se rapprochant le plus possible des conditions biologiques naturelles. Depuis quelques années, les études biologiques se sont donc tournées vers l'utilisation d'outils de micro- et nano-ingénierie afin de générer des matériaux présentant des micro- et nano-domaines de biomolécules à leur surface. Les biomatériaux issus des techniques de micro- et nano-fabrications présentent alors plusieurs avantages : (i) ils permettent de reconstituer au mieux l'environnement naturel des cellules et (ii) ils offrent la possibilité de combiner plusieurs molécules adhésives ou facteurs de croissance.

Le but de ce chapitre est de lister de façon non exhaustive quelques techniques de micro- et nano-fabrication appliquées à l'élaboration de biomatériaux contenant des micro- voire nano-domaines de biomolécules à leur surface.

A) La lithographie optique

A l'heure actuelle les techniques de lithographie, depuis longtemps développées pour la microélectronique, sont les plus utilisées pour la création de micro- et nanodomains. Le terme lithographie inclut une série de techniques de fabrication toutes basées sur le même principe : le transfert de l'image d'un masque sur un substrat. Il existe deux grands types de lithographie :

- Les techniques qui utilisent un masque physique : l'irradiation se fait alors au travers d'un masque qui peut être en contact ou à proximité de la surface du substrat. La méthode la plus utilisée est la photolithographie qui permet d'atteindre une résolution de 700nm.
- Les techniques qui utilisent un masque virtuel : dans ce cas l'irradiation se fait point par point à grâce à un balayage de faisceau piloté par ordinateur. Il s'agit des techniques de lithographie à balayage (d'ions ou d'électrons selon la source utilisée), présentant des résolutions <10nm.

La principale différence entre ces deux types de lithographie est la vitesse de réalisation. En effet, l'utilisation de masques permet une réalisation rapide et instantanée du motif désiré contrairement aux lithographies de balayage qui nécessitent une réalisation point par point. Cependant les limites de résolution obtenues sont généralement bien meilleures avec les techniques de balayage (<10nm).

Par conséquent, les lithographies à balayage concernent, de par leur grande résolution, les techniques de nanofabrication. C'est la raison pour laquelle de telles techniques servent à la réalisation des masques pour la lithographie optique.

(1) Principe de la photolithographie

A l'origine, la photolithographie a été développée pour la fabrication de semi-conducteurs. Les « wafers » de silicium font partie des matériaux les plus utilisés pour ce type d'application grâce à leurs propriétés de semi-conductivité, de planéité et d'état de surface. Cependant, dans le cadre d'applications biologiques d'autres matériaux peuvent être utilisés comme « wafers » (quartz, verre, polymère).

Il existe deux grands types de photolithographie : la lithographie par contact et la lithographie par projection. Dans les deux cas le principe est de transférer l'image d'un masque de haute résolution sur un substrat recouvert d'une résine photosensible. La principale différence vient du fait que dans le cas de la lithographie par contact, le masque est placé au contact de la résine, contrairement à la lithographie par projection.

Cependant le procédé de fabrication reste le même pour ces deux techniques (Figure 23). Avant de transférer l'image du masque sur le substrat, le matériau doit être recouvert par « spin coating » d'une fine couche de polymère photosensible, la photorésine. Une fois la photorésine déposée de façon homogène, elle est chauffée (i) afin de diminuer la quantité de solvants organiques et (ii) de réticuler le polymère. L'étape suivante consiste à irradier la photorésine avec une source lumineuse au travers du masque.

L'action du rayonnement peut alors provoquer des ruptures de liaisons chimiques (phtorésine positive) ou induire au contraire des réticulations (phtorésine négative) qui vont changer radicalement la solubilité des parties irradiées dans le développeur. La dernière étape consiste à immerger le matériau dans un développeur afin de :

- Solubiliser les zones irradiées (phtorésine positive) pour obtenir une image positive du masque.

- Solubiliser les zones non irradiées (photorésine négative) pour obtenir une image négative du masque.

A partir de cette étape, toutes les transformations ultérieures sont principalement effectuées en fonction du type de surface que l'on veut obtenir, cependant dans le cas d'applications biomédicales l'objectif est généralement le même : créer des surfaces possédant des zones d'activité différentes. Par exemple des zones favorables à l'adhésion cellulaire et des zones défavorables à l'adsorption des protéines ou bien des zones présentant deux principes actifs différents.

Dans le cas de la lithographie par contact la source est un rayonnement UV (résolution de 700nm) (ou UV lointain, la résolution est alors de 300nm) alors que la lithographie par projection permet l'utilisation d'extrême UV (résolution de 38nm) et de rayons X (résolution de 30nm). Cependant, compte tenu du coût et des difficultés de mise en œuvre, la lithographie optique à projection est encore limitée au stade de la recherche et du développement.

(2) Applications au dépôt de biomolécules

La photolithographie a été largement développée pour les applications biomédicales ce qui a conduit à un grand nombre de procédés de fabrications. La photolithographie a par exemple été utilisée pour le greffage contrôlé de biomolécules. Veisheh *et al.* (Veisheh *et al.*, 2004) ont réalisé un dépôt de monocouches auto-assemblés thiolatés sur des patches d'or, eux même déposés en surface de silice, afin de greffer de façon covalente de la fibronectine. Le substrat SiO₂ a été modifié avec des PEG-silanes dans le but de réduire l'adsorption de protéines et de limiter l'adhésion cellulaire dans les zones non fonctionnalisées. Après 24 heures de culture, les cellules occupaient uniquement les zones modifiées par le fibronectine.

Cependant, la photolithographie peut présenter un inconvénient majeur lorsqu'elle est destinée à immobiliser des protéines en surface de biomatériaux. En effet, cette technique nécessite l'utilisation de solvants organiques pour enlever la résine après l'immobilisation des biomolécules, pouvant ainsi engendrer une altération voire une dénaturation des protéines. Pour palier à cet inconvénient la photolithographie peut être appliquée à l'immobilisation de peptides courts, moins sujets à ce type de dégradation (Chapitre « Protéines ou peptides ? »).

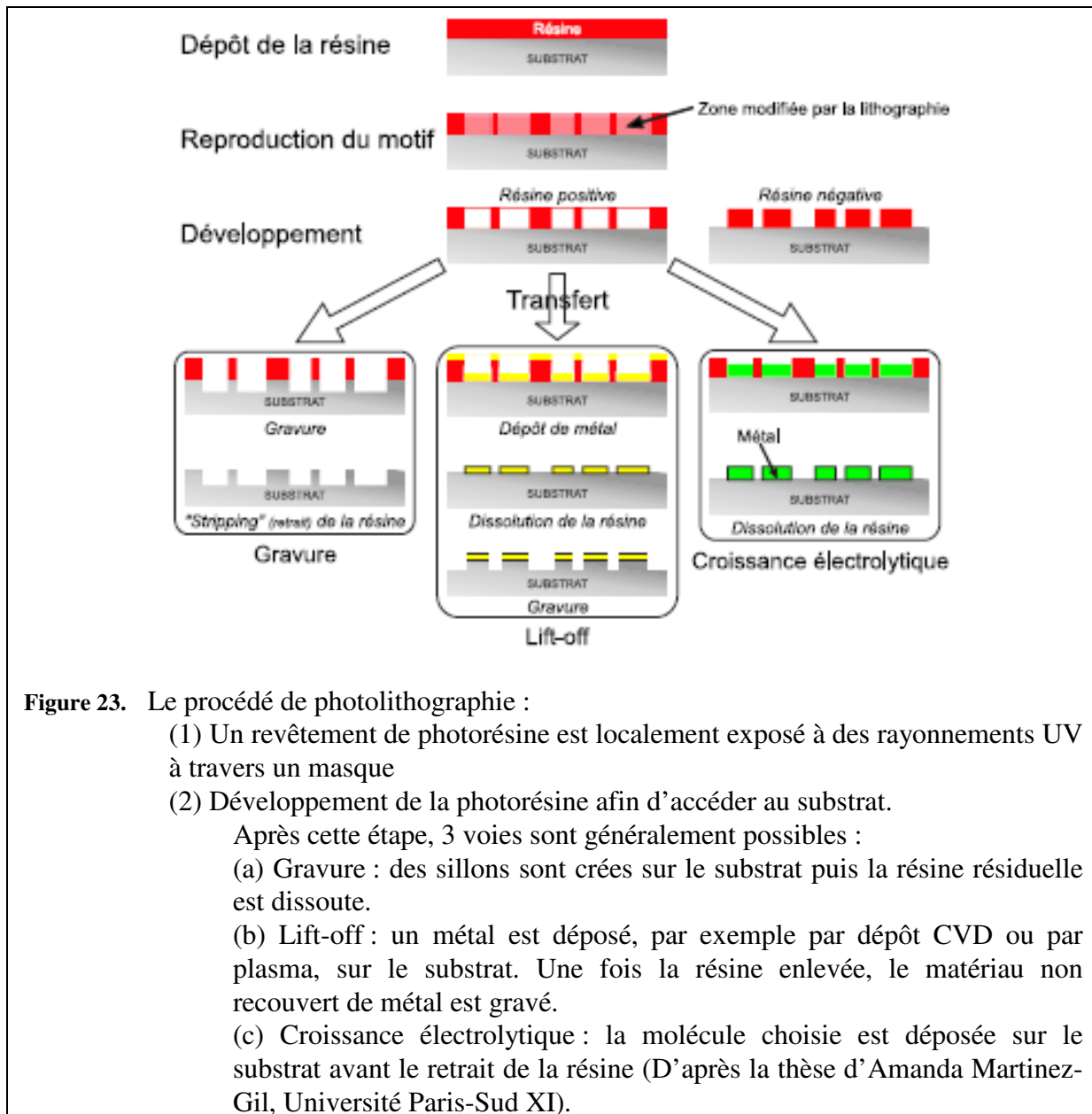


Figure 23. Le procédé de photolithographie :

- (1) Un revêtement de photorésine est localement exposé à des rayonnements UV à travers un masque
- (2) Développement de la photorésine afin d'accéder au substrat.
Après cette étape, 3 voies sont généralement possibles :
 - (a) Gravure : des sillons sont créés sur le substrat puis la résine résiduelle est dissoute.
 - (b) Lift-off : un métal est déposé, par exemple par dépôt CVD ou par plasma, sur le substrat. Une fois la résine enlevée, le matériau non recouvert de métal est gravé.
 - (c) Croissance électrolytique : la molécule choisie est déposée sur le substrat avant le retrait de la résine (D'après la thèse d'Amanda Martinez-Gil, Université Paris-Sud XI).

B) La photoablation par laser à excimères

L'ablation laser est un système de lithographie optique par projection, l'irradiation pouvant s'effectuer avec ou sans masque. Elle peut être utilisée dans le but de créer des sillons à la surface de biomatériaux afin de contrôler les réactions matériaux-tissus. Ils peuvent être utilisés dans deux cas : (i) pour créer des rugosités à la surface du biomatériau, (ii) pour arracher des molécules préalablement immobilisées à la surface du matériau. Les zones modifiées peuvent alors, soit servir de barrière à l'adsorption de protéines, soit favoriser l'adhésion et la prolifération de cellules.

(1) Principe

Parmi tous les lasers existant, les scientifiques se sont aperçus que les laser UV utilisés avec une intensité suffisante, permettaient d'interagir avec la matière, de façon extrêmement localisée et de graver de nombreux matériaux avec une résolution spatiale largement inférieure au micron. En effet, les dimensions minimales des motifs ablatés sont limitées par la diffraction de la lumière et donc favorisées par les faibles longueur d'onde. De plus les radiations UV sont fortement absorbées par la plupart des matériaux organiques, sans provoquer d'effets thermiques trop prononcés.

Les lasers à excimères, apparus il y a une vingtaine d'années, forment un groupe de lasers à gaz pulsés qui émettent, dans l'UV, un faisceau très énergétique durant quelques dizaines de nanosecondes. Les gaz utilisés dans les lasers à excimères sont un mélange de gaz halogène et de gaz inerte. L'association de telles molécules permet, sous certaines conditions d'excitation, de former des espèces appelées excimères (mot provenant de dimères excités) qui n'existe qu'à l'état excité. En fonction des gaz utilisés, il est possible de travailler à diverses longueurs d'onde avec des énergies variables. Les lasers à excimères constituent à l'heure actuelle les sources UV les plus puissantes et possèdent un champ d'application très étendu. Il s'agit, de plus, d'un procédé très souple, propre, qui permet de s'adapter à de nombreux matériaux.

Cependant, la photoablation est un phénomène extrêmement complexe qui fait intervenir, dans un temps très court, un grand nombre de processus physico-chimiques. L'ablation, c'est-à-dire l'interaction du laser avec la matière et les effets qui en résultent, va dépendre d'un grand nombre de paramètres. Ils seront liés :

- Aux propriétés du laser, sa longueur d'onde, sa puissance, sa durée d'impulsion.
- Au matériau irradié : sa nature (métal, polymère), son état de surface (rugosité, chimie), la structure cristalline, ses caractéristiques physiques (optiques et thermiques).
- Aux caractéristiques thermodynamiques de l'atmosphère ambiante.

Les processus de l'interaction laser-matière vont donc être extrêmement variables selon le type de laser et le matériau employé. Néanmoins, à partir du moment où l'énergie déposée dans un volume donné du matériau est suffisante, on va assister à une érosion par couches successives du matériau conduisant à l'ablation.

(2) Applications au dépôt de biomolécules

Depuis de nombreuses années, des équipes de recherche se sont intéressées à l'impact de l'ablation à l'aide d'un laser à excimères sur la réponse biologique. Jae-Suk Lee *et al.* (Lee *et al.*, 1994) ont réalisé des ablations laser sur des surfaces en polystyrène d'une part et en polystyrène modifié par traitement plasma sous oxygène d'autre part. Avant l'ablation, les cellules adhéraient parfaitement sur le PS non traité, alors que dans le cas du PS modifié par plasma l'attachement était minime. Après l'ablation laser, les cellules montraient une nette préférence pour les surfaces ablatées, et ce, quelque soit le matériau de départ. De la même manière, Corey *et al.* (Corey *et al.*, 1991) ont étudié la croissance et la migration de cellules neuronales sur des plaques de poly-L-lysine ablatées par laser. Dans ce cas, les cellules ont adhéré de manière plus importante dans les zones non ablatées. De plus l'espacement entre les zones d'ablation s'est révélé être un paramètre primordial dans la migration cellulaire. En effet, plus les espacements entre les zones ablatées (zone de poly-L-lysine) étaient grands et plus la migration était importante. Plus récemment, l'adhésion préférentielle de cellules endothéliales humaines sur du PET ablaté a été mise en évidence par Duncan *et al.* (Duncan *et al.*, 2007).

De plus, l'ablation laser permet, de la même façon que les techniques de photolithographie, de combiner plusieurs types de molécules à la surface d'un matériau. Thissen *et al.* (Thissen *et al.*, 2002) ont proposé une nouvelle méthode pour obtenir des domaines bioactifs à la surface de polymères. Un revêtement de POE a été réalisé par polymérisation plasma à la surface d'un matériau afin de le rendre défavorable à l'adsorption de protéines puis ce dépôt a été ablaté localement par laser. Du collagène de type I et de la fibronectine ont alors été adsorbés sur les surfaces afin de les rendre attractives à l'adhésion cellulaire. De part la présence du POE, l'adsorption s'est réalisée de manière spécifique sur les zones ablatées par laser. La mise en culture de cellules épithéliales a alors montré une adhésion et un étalement des cellules uniquement sur les zones présentant du collagène et de la fibronectine.

A ce jour, il n'existe aucune étude concernant l'ablation de peptides RGD au laser à excimères.

C) La lithographie molle

La plupart des méthodes utilisées pour la microfabrication de biomatériaux se basent sur le couplage de molécules (protéines, peptides) sur des domaines préalablement définis. Il existe

cependant des techniques qui permettent le dépôt direct de biomolécules à la surface d'un matériau. Le terme « lithographie molle » englobe plusieurs techniques dont le point commun est l'utilisation d'un matériau élastomère comme tampon ou moule afin de transférer un domaine sur un substrat. Les techniques sont nombreuses mais la plus utilisée est l'impression par microcontact (μ CP).

(a) Principe de l'impression par microcontact (μ CT)

L'impression par microcontact est de loin la technique de lithographie molle la plus utilisée. A l'origine développée pour des applications en microélectronique (Kumar et Whitesides, 1993), la μ CP a rapidement été adaptée pour produire des matériaux destinés à l'adhésion cellulaire (Singhvi *et al.*, 1994). La grande popularité de cette technique réside dans sa simplicité d'utilisation, son faible coût, sa grande flexibilité dans le choix du substrat et du matériau à imprimer et sa résolution de 50nm.

La réalisation de domaines par le procédé μ CP est représentée en figure 24. Premièrement un tampon en élastomère (PDMS : Polydiméthylsiloxane) est réalisé par moulage dans un moule en silicone microstructuré. Le plus souvent les masques sont fabriqués par des techniques de lithographie optique par projection ou à balayage, ce qui leur confère une grande précision. Le tampon ainsi obtenu est alors trempé dans « l'encre » désirée, c'est à dire dans la molécule à immobiliser en surface du matériau. Puis l'impression se fait par simple contact du tampon sur le matériau. En règle générale une dernière étape consiste à recouvrir les zones non encrées du matériau avec une deuxième molécule.

Dans le cadre de modelage d'une surface pour des applications biologiques, nous pouvons distinguer deux types de μ CP : μ CP par modelage indirect et μ CP par modelage direct. Dans le premier cas l'encre utilisée pour la modification devra être, par la suite, biofonctionnalisée afin que la surface présente des affinités biologiques avec les cellules, alors que dans le deuxième cas l'encre est une solution de biomolécules capables de promouvoir l'adhésion cellulaire (peptides, protéines).

(b) Applications au dépôt de biomolécules

1- Modelage indirect

Il existe à l'heure actuelle de nombreuses publications concernant l'adhésion des cellules sur des surfaces modifiées par μ CP. En règle générale, ces études utilisent le principe des SAM's pour imprimer des domaines hydrophobes alkanothiolates sur des matériaux revêtus

d'un substrat d'or, atteignant alors une résolution de 50nm (Chen *et al.*, 1998; Mrksich *et al.*, 1997). D'autres SAM's sont néanmoins possibles, comme par exemple l'immobilisation d'alkanothiols sur un substrat d'argent ou de siloxane sur de la silice, mais les résolutions obtenues ne sont respectivement que de 100nm et 500nm.

La deuxième étape consiste alors à passiver, c'est-à-dire à rendre résistant aux protéines, les zones non imprimées par une adsorption de POE-thiol. Les régions hydrophobes sont alors biofonctionnalisées par l'adsorption de fibronectine (ou d'autres protéines d'intérêt). Olivia *et al.* (Oliva *et al.*, 2003) ont choisi une autre approche pour fonctionnaliser des lames de verre par μ CP. La première étape consistait à créer des domaines d'une protéine A sur la surface. Une deuxième protéine B, impliquée dans la reconstruction des axones, a alors été immobilisée par des réactions spécifiques sur la protéine A. La dernière étape de la fonctionnalisation a été de recouvrir les zones vides par de la poly-L-lysine et de mettre en culture des neurones. Ils ont alors pu observer une croissance sélective des axones sur les domaines alors que les dendrites s'étaient étalées sur toute la surface.

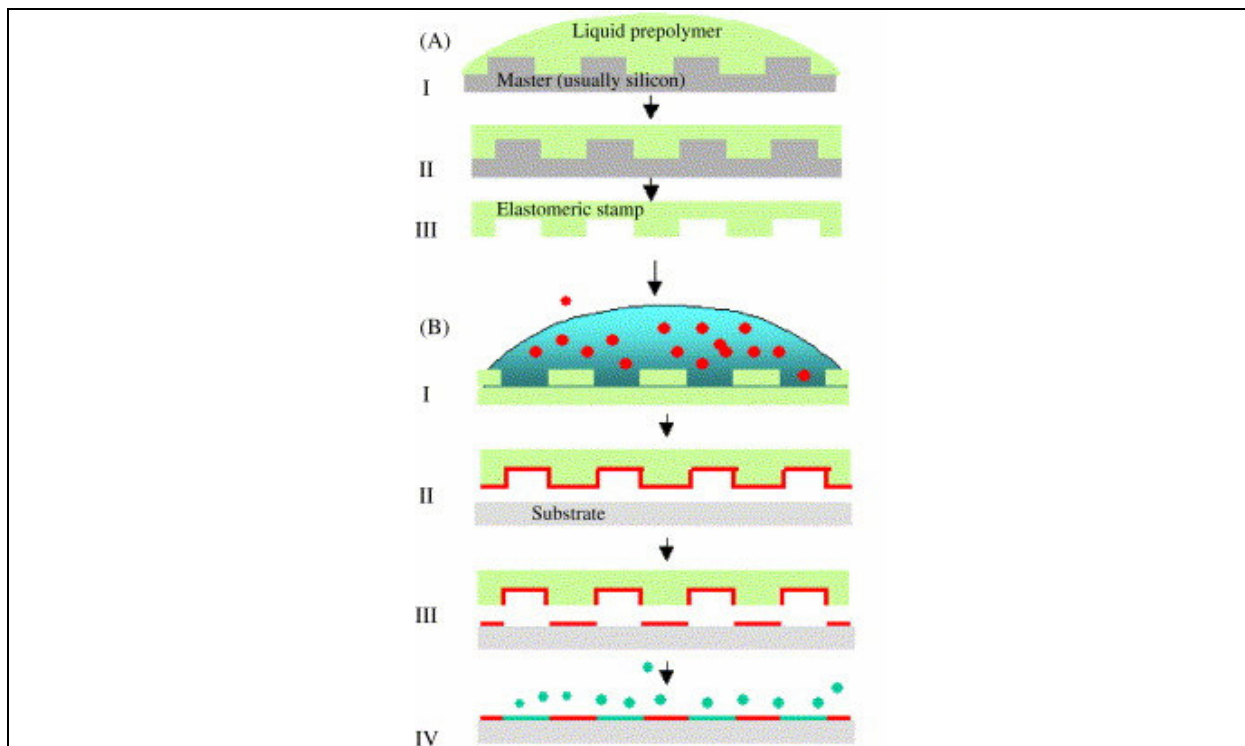


Figure 24. Schéma de principe de l'impression par microcontact, D'après (Falconnet *et al.*, 2006).

- (A) Un pré-polymère liquide est déposé dans un moule en silicone (I). Après la cuisson (II), le tampon élastomérique est prêt à être utilisé (III).
- (B) Le tampon est encre dans une solution contenant les (bio) molécules à déposer (I), les (bio) molécules sont alors imprimées sur le substrat (II). Après que le tampon est été retiré (III), les zones non recouvertes de (bio) molécules sont passivées avec une deuxième solution de molécules (IV).

2- Modelage direct

Il existe de nombreuses approches permettant de créer des domaines par l'immobilisation directe de molécules bioactives, telles que des molécules favorisant l'adhésion cellulaire. Le choix des molécules se fait alors en fonction de l'application désirée. Les premières expériences ont été réalisées par Bernard *et al.* (Bernard *et al.*, 1998) qui ont tamponné différentes protéines modèles, telles que des immunoglobulines ou de l'albumine. De la même manière, James *et al.* (James *et al.*, 1998) ont utilisé de la Poly-L-lysine pour favoriser l'attachement cellulaire. Il existe également plusieurs publications qui montrent l'intérêt d'utiliser la fibronectine comme encre pour obtenir des domaines cellulaires (Csucs *et al.*, 2003; Kam et Boxer, 2001; Lehnert *et al.*, 2004). La croissance des neurones a, de la même manière, pu être contrôlée par le modelage de la laminine ou de polypeptides (Klein *et al.*, 1999). Cependant la stabilité de ces domaines peut être limitée dans le cadre d'une utilisation à long terme, et ce à cause du fait que les liaisons mises en jeu ne sont pas covalentes. C'est la raison pour laquelle des études ont tenté de réaliser des domaines par modelage direct présentant des liaisons covalentes. Ainsi la silanisation d'un dépôt d'oxyde peut offrir des possibilités de greffage covalent (Cornish *et al.*, 2002; Scholl *et al.*, 2000), il en est de même pour l'activation chimique de différentes surfaces polymériques (Hyun *et al.*, 2001).

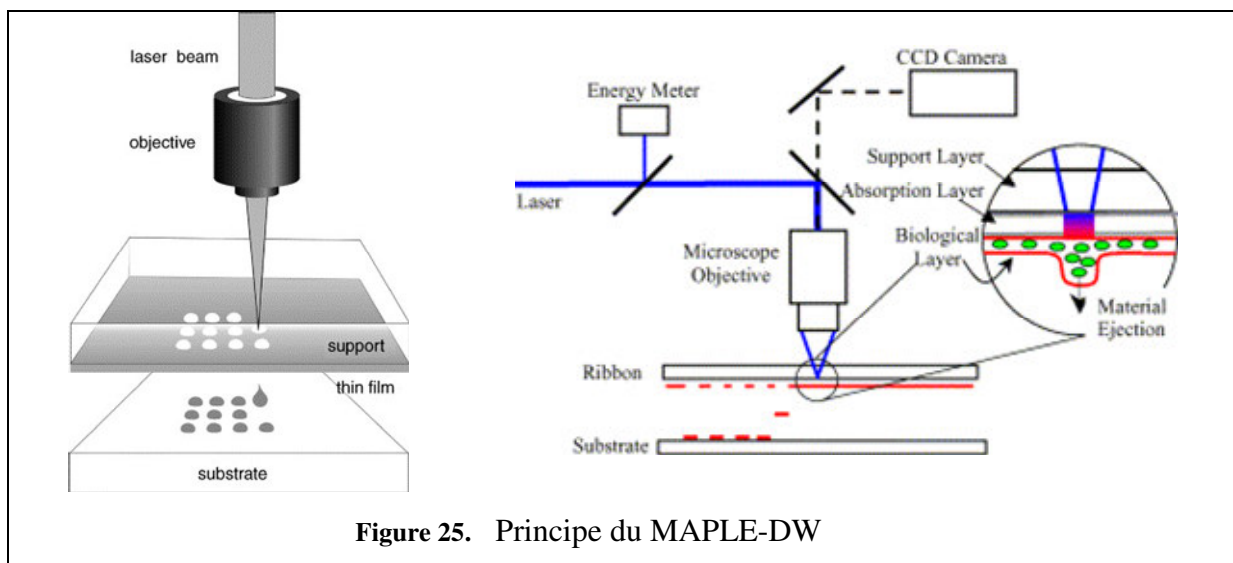
D) Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation - Direct Writing (MAPLE-DW)

(1) Principe

Le Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation-Direct Writing (MAPLE-DW) a initialement été développé pour produire des domaines sur des matériaux métalliques, céramiques, polymères ou organométalliques pour le développement de résistances, de capacités ou de capteurs chimiques. Ce n'est que plus tard que cette technique a été utilisée pour déposer, à la surface de matériaux, des entités biologiques telles que des cellules vivantes ou des protéines destinées à la réalisation de biopuces.

Le principe de fonctionnement du MAPLE-DW est détaillé dans la figure 25. Le matériau à déposer (polymère, peptide, protéine ou cellule) est mélangé à une matrice ayant la particularité d'absorber l'énergie lumineuse. Cette solution est alors déposée à l'aide d'une tournette en fine couche sur une lame de verre, la lame donneuse. Lors de l'irradiation laser, la matrice est vaporisée, ce qui entraîne la propulsion de la matrice contenant le principe actif

choisi de la lame donneuse sur le substrat. Ce procédé MAPLE-DW présente de nombreux avantages par rapport aux techniques qui utilisent l'écriture directe par laser : (i) l'énergie est absorbée par la matrice et non par le principe actif, il n'y a donc pas de dégradation des matières organiques (ii) le dépôt se fait dans les conditions de pression et de température ambiantes, (iii) la quantité de molécule transférée peut facilement être quantifiée, (iv) il est possible de réaliser des structures multicouches par projection séquentielle de plusieurs lames donneuses, (v) les risques de contamination sont limités du fait qu'il n'y a pas de contact entre le système de projection et le substrat.



(2) Applications au dépôt de biomolécules

Dès les premières utilisations pour des applications biomédicales, de nombreux chercheurs se sont intéressés à la conservation d'activité biologique des molécules transférées par MAPLE-DW. C'est ainsi que Ringeisen *et al.* (Ringeisen *et al.*, 2002) ont utilisé le MAPLE-DW pour créer des biopuces en transférant quelques picolitres d'une solution de protéines sur une lame de verre fonctionnalisée. Le couplage des protéines à des anticorps a pu mettre en évidence que ces protéines n'avaient pas été dénaturées durant le transfert et qu'elles avaient conservé leur activité biologique. Cette même équipe a, par la suite, prouvé la faisabilité du transfert d'*Escherichia coli* vivantes sur des lames de verre (Ringeisen *et al.*, 2002). Plus récemment, Barron *et al.* (Barron *et al.*, 2004) ont transféré des cellules humaines à partir d'une matrice en hydrogel et ont montré que le taux de viabilité après dépôt avoisinait les 100%.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune application du MAPLE-DW au dépôt de biomolécules adhésives en surface de biomatériaux. Cependant, le greffage de peptides RGD à une échelle micro- voire nanométrique pourrait être réalisé par le biais de cette technique.

DEUXIEME PARTIE : ARTICLES

ARTICLES 1 ET 2

**QUELLE DENSITE DE PEPTIDES RGD IMMOBILISER EN
SURFACE DE BIOMATERIAUX ?**

Introduction

De part ses propriétés mécaniques et sa biocompatibilité, le polyéthylène téréphtalate (PET) est largement utilisé pour la culture cellulaire (Thermanox® or Mylar®), les sutures chirurgicales ou les prothèses vasculaires (Dacron®). Même si le Dacron® procure un taux de réussite avoisinant les 93% dans le cas de remplacement de vaisseaux de gros diamètres, les risques de thrombose limitent son utilisation pour les vaisseaux de diamètre <6mm.

Afin de palier à cet inconvénient, de nombreuses équipes de recherche se tournent aujourd'hui vers l'ingénierie tissulaire et tentent de modifier la surface du PET pour favoriser sa biointégration. A l'heure actuelle, une approche séduisante consiste à associer une composante synthétique et une composante cellulaire (cellules autologues du patient) afin de mieux contrôler les interactions matériaux-tissus, c'est le concept des matériaux hybrides. En effet, l'ensemencement d'un biomatériau avec les cellules autologues du patient avant l'implantation permettrait d'obtenir une parfaite coopération entre la surface de la prothèse et les cellules qui devront le coloniser. Cependant, l'obtention d'un tel matériau hybride nécessite que les cellules adhèrent en grand nombre et avec une force d'adhésion importante sur la surface du biomatériau. Par conséquent cette surface devra être modifiée afin de devenir plus « attractive » pour les cellules. Afin d'obtenir de tels résultats, une des approches consiste à fonctionnaliser la surface du biomatériau avec des ligands « pro-adhésifs » afin de favoriser l'adhésion des cellules et la colonisation du biomatériau.

Depuis 1984, la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) est connue pour être la séquence active des protéines adhésives de la matrice extracellulaire, telles que la vitronectine, la fibronectine et le collagène, responsable de l'adhésion cellulaire (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984). Ces dernières années de nombreux chercheurs se sont donc intéressés à la modification de surface des biomatériaux par l'immobilisation de peptides RGD. Les premières modifications ont été réalisées par l'adsorption de protéines adhésives contenant la séquence RGD. Cependant de tels matériaux présentaient un potentiel de réussite limité pour des applications à long terme à cause de problèmes liés à l'utilisation de protéines, tels que les risques de désorption, d'échange et donc de diffusion des biomolécules loin du site d'implantation. De plus, il a très vite été démontré qu'une liaison stable des peptides RGD en surface des biomatériaux était nécessaire pour permettre une forte adhésion cellulaire (Choquet *et al.*, 1997). Un autre problème présent lors de l'adsorption de ligands pro-adhésif est lié au fait qu'il est impossible

de maîtriser la densité de ligands immobilisés en surface du biomatériau. Or, ce paramètre est rapidement apparu comme étant essentiel dans le contrôle des interactions matériau-tissu. En 1991, Massia et Hubbell ont démontré que l'adhésion cellulaire suivait une croissance sigmoïde en fonction de la densité de peptides RGD immobilisés en surface de lames de verre (Massia et Hubbell, 1991). Il ont alors prouvé qu'une faible quantité de peptides RGD (1 fmol/cm²) suffisait à induire l'adhésion des cellules mais qu'une densité plus élevée (10 fmol/cm²) était nécessaire à la formation de plaques focales d'adhésion. Depuis, de nombreux chercheurs ont tenté de corréler l'adhésion cellulaire et la densité de peptides RGD immobilisée en surface de biomatériaux (Kang *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 1998). Cependant, toutes les études réalisées jusqu'à aujourd'hui utilisent des matériaux, des méthodes de fonctionnalisation, des peptides, des types cellulaires et des moyens de quantification des peptides différents, il est par conséquent impossible d'établir un consensus concernant la relation densité de RGD- adhésion cellulaire (Hersel *et al.*, 2003).

L'objectif de ces travaux était de réaliser un matériau hybride modèle associant le PET, et une lignée cellulaire pré-ostéoblastique de souris (MC3T3). Pour contrôler l'adhésion des MC3T3 sur le PET, la surface du polymère a été modifiée afin de présenter des densités variables de peptides RGD dans le but de répondre à la question : quelle densité de peptides doit-on immobiliser en surface d'un biomatériau ?

↳ Le premier article, "*RGD Peptides Grafting onto Poly (ethylene terephthalate) with well controlled densities*" (*Biomolecular Engineering, sous presse*) propose :

- La mise au point de plusieurs méthodes de fonctionnalisation permettant l'immobilisation pérenne par liaison covalente de densités variables et contrôlées de peptides RGD en surface de PET.
- L'évaluation de la densité par une méthode originale basée sur l'imagerie β haute résolution couplée à l'utilisation d'acides aminés (Chapitre H-2-c : « Imagerie bêta haute résolution »).

↳ Le deuxième article, « *RGD Peptides Grafting onto Poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities: Physico-chemical and biological characterisation* » (*Advanced functional materials, soumis*), présente les résultats obtenus lors des caractérisations physico-chimiques et biologiques des matériaux ainsi fonctionnalisés :

- Concernant la caractérisation physico-chimique : les % atomiques présents en surface ainsi que les liaisons chimiques établies sont caractérisées par spectroscopie de photoélectrons X, La rugosité est déterminée par microscopie à force atomique et la mesure des angles de contact renseigne sur le caractère hydrophile des surfaces.
- Concernant la caractérisation biologique : l'étude de l'adhésion cellulaire est réalisée par un test colorimétrique, par l'observation, après immunomarquage des protéines impliquées dans la formation des plaques focales, et par une quantification des contacts focaux.

↳ Les principaux résultats ayant été obtenus dans ces deux articles sont :

- La spectroscopie de photoélectrons X a été utilisée à chaque étape de fonctionnalisation pour valider les modifications de surface. Les conclusions permettent de confirmer un greffage chimique covalent du peptide en surface du PET.
- L'imagerie β haute résolution couplée à l'utilisation d'acides aminés radiomarqués a (i) permis l'évaluation de la densité de peptides immobilisés en surface du PET, (ii) confirmé la présence d'une liaison covalente stable entre les peptides et la surface, (iii) prouvé une répartition homogène des peptides. Suivant des traitements chimiques de surface réalisés, les densités de peptides greffés en surface varient entre 0,6 et 2,4 pmol/mm².
- Les mesures d'angles de contact ont montré une augmentation du caractère hydrophile en fonction de la densité de peptides greffés en surface. Ces résultats confirment la présence des peptides RGD en surface.

- L'analyse de la morphologie de surface réalisée par MFA a montré une augmentation de la rugosité moyenne en fonction de la densité de peptides. Ces analyses ont de plus mis en évidence l'homogénéité du greffage à la surface du polymère.
- L'étude de l'attachement cellulaire (MC3T3) sur les matériaux greffés de peptides RGD a montré que l'adhésion des cellules dépendait du taux de greffage de peptides en surface. En effet, plus la densité de peptides est élevée, plus le nombre de cellules adhérentes en surface est important. Cependant une densité peptidique $> 0,6 \text{ pmol/mm}^2$ est nécessaire pour favoriser l'adhésion des cellules.
- Le marquage par immunofluorescence de la vinculine et de la F-actine a permis de visualiser les contacts focaux formés par les cellules sur les différents matériaux. Même si la présence de peptides RGD induit la formation de contacts focaux, de nettes différences sont apparues en fonction de la densité de peptides en surface. En effet, pour les faibles densités de peptides en surface ($0,6$ et 1 pmol/mm^2), peu ou pas de contacts focaux ont été observés. De plus, une évaluation de la densité de contacts focaux a pu mettre en évidence une corrélation entre la densité de RGD en surface du PET et la densité de contacts focaux formés. Plus la densité de peptides RGD immobilisés en surface du PET est élevée et plus le nombre de contacts focaux est important.
- Des matériaux ont été réalisés par greffage de peptides RGE dans le but d'être utilisés comme témoins négatifs. Ces matériaux ont subi exactement les mêmes modifications chimiques et présentent les mêmes caractéristiques de surface que les matériaux RGD. Les cellules adhérentes sur ces matériaux ne forment pas de contacts focaux. Ce résultat a permis de vérifier que l'adhésion observée sur le PET-RGD était bien due à la présence des peptides en surface et non aux propriétés physico-chimiques du matériau (modification du caractère hydrophile, rugosité).

Premier article

RGD Peptides Grafting onto Poly (ethylene terephthalate) with well controlled densities

C. Chollet, C. Chanseau, B. Brouillaud, M.C. Durrieu
Biomolecular engineering, sous presse



RGD peptides grafting onto poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities

C. Chollet^{a,b,c,*}, C. Chanseau^{a,b,c}, B. Brouillaud^{a,b,c}, M.C. Durrieu^{a,b,c}

^aINSERM U577, Bordeaux, F-33076, France

^bUniversité Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076, France

^c146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

Abstract

The aim of this study was to graft RGD peptides with well controlled densities onto poly(ethylene terephthalate) (PET) film surfaces. Biomimetic modifications were performed by means of a four-step reaction procedure: surface modification in order to create –COOH groups onto polymer surface, coupling agent grafting and finally immobilization of peptides. The originality of this work is to evaluate several grafted densities peptides. Toluidine blue and high-resolution μ -imager (using [³H]-Lys) were used to evaluate densities. Moreover, μ -imager has exhibited the stability of peptides grafted onto the surface when treated under harsh conditions. Benefits of the as-proposed method were related to the different concentrations of peptides grafted onto the surface as well as the capacity of RGD peptide to interact with integrin receptors.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Biomaterial; RGD density; Grafting; PET

1. Introduction

Poly(ethylene terephthalate) (PET) has been most widely used as the prosthetic arterial graft for medium and large diameter sites because of its desirable properties, such as strength and modulus. However, the surface of PET materials is haemocompatible. Nevertheless, the surface should be improved for good performance in these applications; we can control parameters like protein adsorption or increase cell attachment for better implantation.

A number of researchers have focused on the hybridization of synthetic polymers with biologically active molecules in order to produce tissue-compatible materials. Since 1984, the RGD (Arg–Gly–Asp) peptide is well known to be the active sequence of adhesive proteins of the extracellular matrix, such as vitronectin, fibronectin and collagen (Hubbell, 1999; Pierschbacher and Ruoslahti, 1984).

Massia and Hubbell have demonstrated that polymeric surfaces with grafted RGD peptides were found to exhibit biological activity (Massia and Hubbell, 1990). They have also shown that at very low RGD peptide densities, fibroblasts attach but do not spread while at higher densities (1 fmol/cm²), i.e.

when the spacing between peptides reaches 440 nm, they do (Massia and Hubbell, 1991a; Massia et al., 1990). Furthermore, when the RGD density reaches 10 fmol/cm² (corresponding to a spacing of at least 140 nm), focal contact formation (small region on the surface of the fibroblast that is anchored to the substrate) and normal stress fibre organization were demonstrated. More recently, interest of clustering peptides on focal contact formation has also been clarified (Irvine et al., 2002; Maheshwari et al., 2000).

In the present paper, specific interest has been devoted to the design of new hybrid materials associating poly(ethylene terephthalate) and cells through the grafting of different amount of RGD containing peptides onto polymer surface.

This aim of this work is to present:

- First, peptides are covalently grafted onto PET surface that procures stability to the material even in harsh conditions.
- Second, we purpose in this work new techniques to measure peptide densities: toluidine blue for COOH amounts and high-resolution μ -imager for peptides densities.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The PET sample used is a commercial film obtained from Goodfellow. It is in the form of bi-oriented film with a thickness of 75 μ m. Inorganic reagents

* Corresponding author at: INSERM U577, Bordeaux, F-33076, France.

Tel.: +33 5 57 57 17 30; fax: +33 5 56 90 05 17.

E-mail address: celine.chollet@bordeaux.inserm.fr (C. Chollet).

(NaOH, KMnO₄, H₂SO₄, HCl) were obtained by Sigma, France. Acetonitrile, dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS) and 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES buffer) were obtained from Aldrich, France. RGDC peptides were obtained from Bachem, France. [³H]-L-lysine solution with 150 mCi/mmol was purchased from Amersham, France.

2.2. Methods

2.2.1. Surface preparation of PET and covalent grafting of RGDC peptide with COOH anchor

Polymer surfaces were modified according to Boxus et al. (Boxus, 1996) with some modifications. The peptide immobilization strategy has been performed following this procedure, also presented in Fig. 1:

1. First, materials were modified in order to create COOH functions onto PET surface. Protocols are different for each density expected; nomenclature used for treatment 1, treatment 2, treatment 3 and treatment 4 are, respectively, "H₁", "UV", "Native oxidized" and "Native grafted"

- Density 1: "H₁"
 - PET is hydrolysed with 0.25 g NaOH, 25 ml H₂O, 25 ml acetonitrile during 15 h at 60 °C.
 - PET is oxidized by KMnO₄ in H₂SO₄ (1.2 N) during 1 h at 60 °C. After reaction, PET is rinsed one time with HCl (6 N, 10 min) and two times in MilliQ water (2 × 10 min), then samples dried on Whatman paper.
- Density 2: "UV"

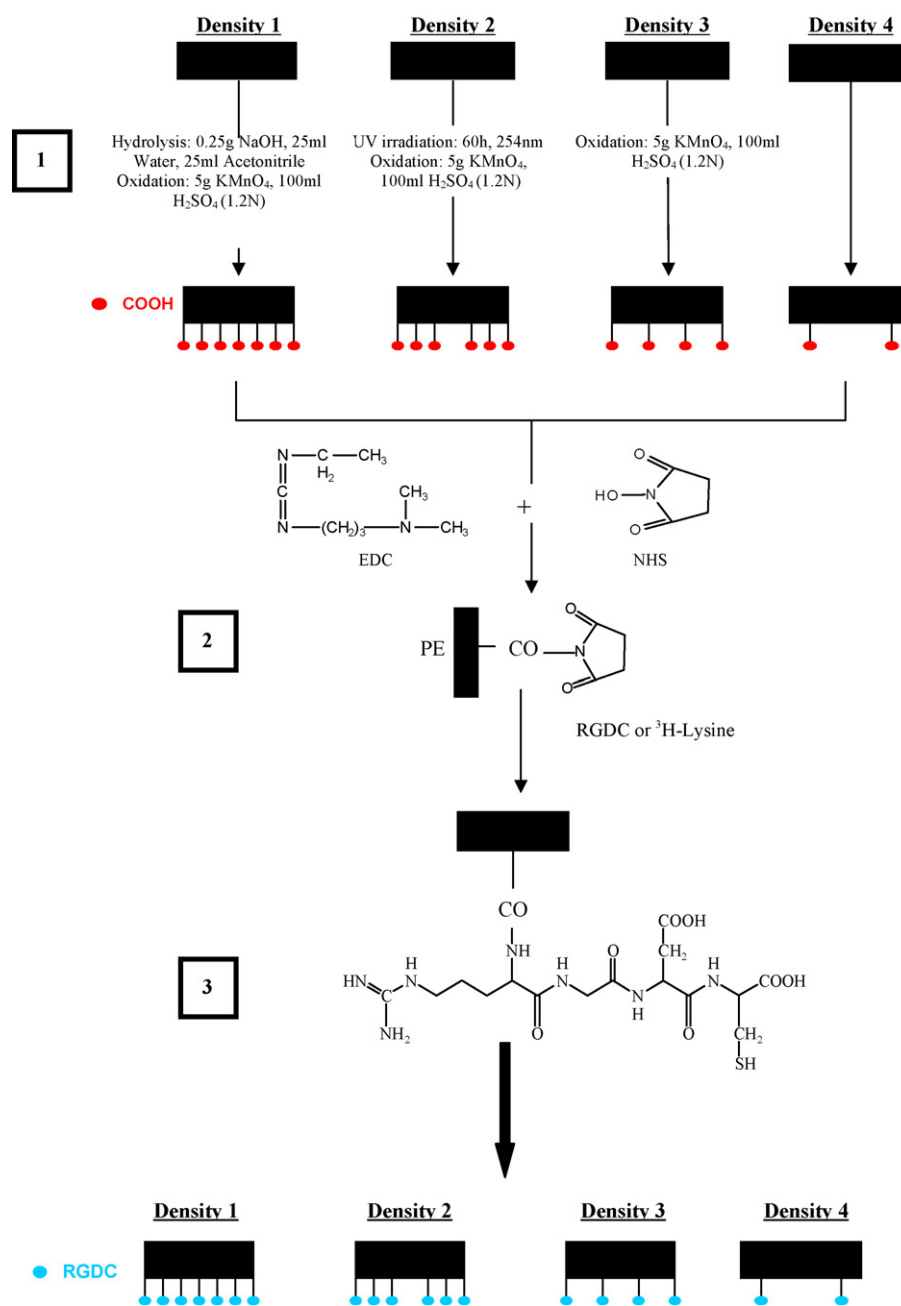


Fig. 1. Sequence of the PET surface modification procedure. (1) PET surface preparation in order to obtain -COOH end chains, (2) reaction with dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS), (3) immobilization of RGDC or ³H-lysine containing peptide through amine bonding.

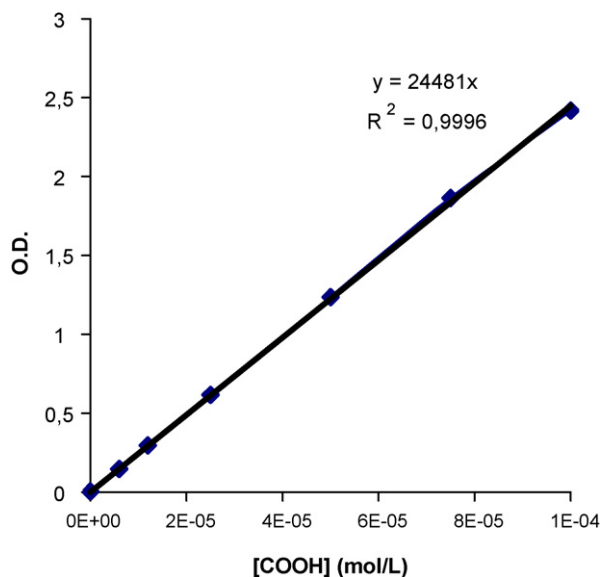


Fig. 2. Acetic acid calibration plot.

- PET is modified by UV irradiation during 60 h on each face (Fechine, 2004; Jeon, 2004; Wang, 1999).
 - PET is oxidized by the same way than density 1.
 - Density 3: “Native oxidized”
 - PET is oxidized by the same way than density 1.
 - Density 4: “Native grafted”
 - PET is used without modification.
2. PET-COOH were immersed in a solution of dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (0.2 M) + *N*-hydroxysuccinimide (0.1 M) in (2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid (0.1 M in MilliQ water).
 3. The immobilization of cell-binding peptides containing the RGD sequence and cysteine, was realized in a solution of RGDC or lysine/ H_2O ($C = 2 \times 10^{-3}$ M) for 15 h at room temperature. After grafting, the disks were rinsed every time with MilliQ water during 1 week.

2.2.2. Surface characterisation

2.2.2.1. Toluidine blue. After the reaction, the amount of COOH grafted onto the film was determined using the toluidine blue-O (TBO) method, in which the dye stains the deprotonated acid groups through ionic interaction. In brief, a solution of 5×10^{-4} M TBO was prepared by dissolving TBO powder in NaOH solution (pH 10). Modified PET disc was placed in a 10 ml tube. Ten millilitres of TBO solution were added on the PET surface and the sample was shaken for 6 h. After TBO binding, the supernatant was removed from tube and the stained PET surface was washed with NaOH solution (pH 10) and pure water for two times. Five millilitres of 50% acetic acid was added to remove the TBO dye from the carboxyl groups on PET during 10 min. Two hundred microlitres of the washed solution from each sample was loaded into 96 well plate and the optical density at 633 nm is measured with a 96 well plate reader. The concentration of the carboxyl groups is determined with a calibration plot (Fig. 2) containing several samples with different carboxyl group concentrations. The calculation is based on the assumption that 1 mol of TBO has complexed exactly with 1 mol carboxyl groups (Emiko Uchida and Yoshito, 1993).

2.2.2.2. Determination of peptides densities by high-resolution μ -imager. A micro-imager is based on contact imaging through a solid scintillator sheet (Fig. 3). Light emitted is amplified through an image intensifier tube and is analysed with a CCD camera. The full field of view is smaller than the first one (24 mm \times 32 mm) but a better spatial resolution is obtained (typically 15 μ m for 3H , 20 μ m for ^{14}C and ^{35}S). The specifications of this detector are: efficiency 50–100% depending on isotope, linear response over a dynamic range of 10^4 ,

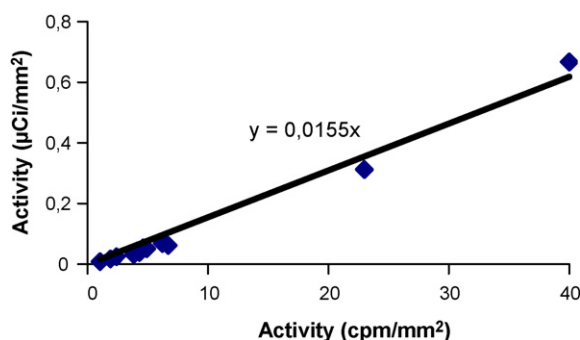


Fig. 4. 3H -lysine calibration curve.

smallest activity detected: 0.4 cpm/mm² for 3H and 0.04 cpm/mm² for ^{14}C . Using these detectors, quantification is much easier and more precise than that of the radiological film because of direct counting of radioactivity.

Micro-imager was developed at the Institute of Nuclear Physics IN2P3-CNRS-ORSAY France (Charon et al., 1991; Crumeyrolle-Arias et al., 1996) and is based on contact imaging through a solid scintillation sheet.

The basic principle of these detector is presented in Fig. 3 and detailed elsewhere (Barthe et al., 1999; Laniece et al., 1994). When an emitted β^- particle or an electron interacts with the detection medium, part of their energy is converted into light.

The corresponding light spots are recorded by an electronic system composed of an intensified Charge Coupled Device (CCD) camera, an interface board and a PC. The count and localization by a centroid calculation of each light distribution creates the quantitative cartography of the activity in the sample. The characteristic of the light emitted, which is analysed during the acquisition, depends on the energy of the particle. This property suggests new potential applications in the field of β -rays selection according to their energy.

Quantitatively, peptides concentration was evaluated by grafting 3H -lysine instead of RGDC peptide (Fig. 1). Radiolabeled lysine grafting was performed incubating (step 4 of the chemical procedure) PET samples in a solution of 3H -Lys diluted in lysine solution (2×10^{-3} M). Radioactivity of this latter solution was adjusted to 6 μ Ci/ml. The amount C of radiolabeled cysteine grafted onto the surface (in nmol/mm²) was calculated according to the following formula:

$$C = \frac{A \times C_0}{A_0} \quad (1)$$

where A is the activity of the as-treated samples (in μ Ci/mm²); C_0 the peptide concentration in 1 ml of mother solution incubation solution (in nmol); A_0 the activity of 1 ml of mother solution (in μ Ci/mm²). This latter activity was calibrated using β -Vision™ Biospace software determining the relationship between μ Ci and cpm/mm² units. Such a fitting was performed by measuring activities of given dilute solutions. Measuring radioactivity of 10 solutions by

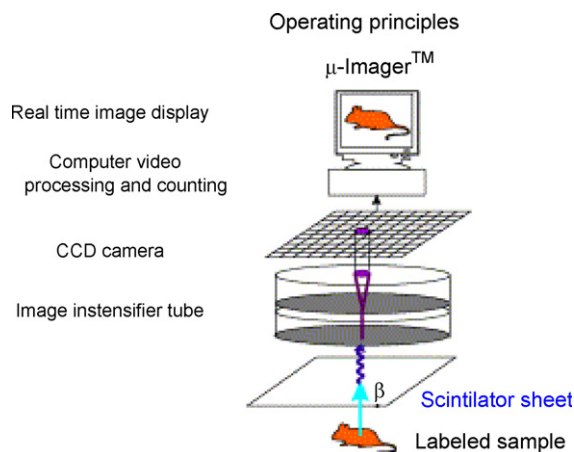


Fig. 3. Micro-imager principle.

μ -imager, we can establish relation between activity in cpm/mm^2 and activity in $\mu\text{Ci}/\text{mm}^2$:

$$A (\text{micro Ci}/\text{mm}^2) = \frac{A (\text{cpm}/\text{mm}^2)}{81328}$$

To evaluate the stability of grafted lysine in water, the ^3H activity (in cpm/mm^2) was calibrated at each analysis (Fig. 4). Calibration of the entire probed area was first done stating the signal corresponding to the activity of ^{14}C standard slides to a constant level. The ^3H radioactive decay was finally taken into account since its half-life (14 years) is negligible versus the experiment duration.

3. Results

All materials were characterised by XPS, contact angle and AFM, these results will be presented in a future paper.

3.1. Carboxyl end groups densities: toluidine blue staining

Toluidine blue method have done results about the amount of COOH created onto PET surface (Fig. 5). Densities obtained for “Native”, “Native oxidized”, “H₁” and “UV” treatments are, respectively, 20, 70, 160 and 240 pmol/mm^2 . These results show that we have four different COOH densities onto PET surface.

3.1.1. Micro-imager: amount and stability of RGD peptides grafted on the PET surface

Peptides concentration was estimated by grafting ^3H -Lys instead of RGDC (Fig. 1) and hence measuring activity A (in cpm/mm^2) of the as-treated materials by high-resolution μ -imager. Materials are then treated in harsh conditions to observe the decrease of the peptide amount (Fig. 6). Initial decrease of activity represents adsorbed and coated RGDC. However after 600 h of washing we observed a stage, we can then say that RGDC concentration obtained represent only grafted molecules. Loss of biomolecules from PET was followed by measuring the activity of the radiolabeled materials sonicated (1 h before each analysis) or stirred in water. The as-measured activity was then calibrated stating the signal corresponding to the activity of ^{14}C standard slides to a constant level.

4. Discussion

RGD-containing peptides have been used to improve the qualities of the cell culture supports, either by coating, or by covalent grafting since 1984 (Pierschbacher and Ruoslahti,

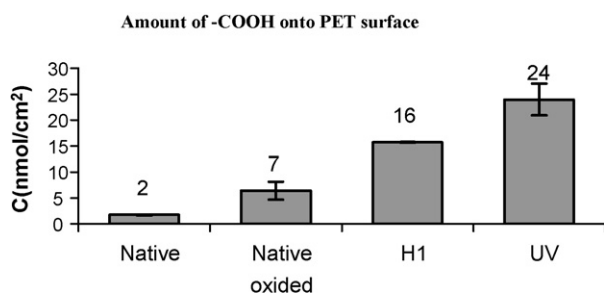


Fig. 5. [COOH] densities obtained by toluidine blue staining.

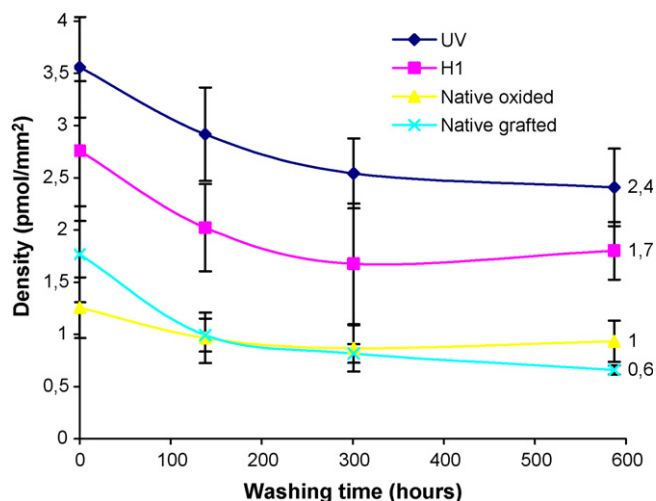


Fig. 6. RGD peptide density after washing in harsh conditions.

1984). Surface modification has been proposed as a method to engineer substrates that elicit specific responses from the cells attached to them. Immobilization of adhesive peptides on solid substrates has advantages over protein adsorption, since the latter method can lead to a loss of protein function due to conformational changes, proteolytic degradation, or denaturation (Kouvroukoglou et al., 2000). Numerous studies proved that immobilization of adhesive peptides on materials enhances endothelial (Hubbell et al., 1991, 1992; Massia and Hubbell, 1990, 1991a,b; Massia et al., 1990) and osteoblast (Bartouilh De Taillac et al., 2004; Pallu et al., 2005; Porte-Durrieu et al., 2004) cells adhesion.

More recently researchers have focused on the poly(ethylene terephthalate) modification by RGD. This material has been most widely used as the prosthetic arterial graft for medium and large diameter sites because of its desirable properties, such as strength and modulus. Marchand et al. (Biltresse et al., 2005; Boxus, 1996; Deldime et al., 1995; Marchand-Brynaert et al., 1995) performed PET surface modification and grafting of peptidomimetics in order to study impact of spacer-arm and peptide density. The amounts of peptides obtained varied between 30 and 100 pmol/cm^2 (Biltresse et al., 2005). However, a clear quantitative correlation between surface density of peptidomimetics and cell adhesion has not been established. In order to determine the number of biomolecules grafted onto the surface as well as to estimate their distribution during aggressive treatment, our interest focused on an innovative radiolabeling technique. Previous studies that proposed to quantify amount of grafted peptides by measuring the activity of radiolabeled PET using scintillation counting (what implies to measure the radioactivity in solution or suspension) (Biltresse et al., 2005; Marchand-Brynaert et al., 1995), ^{125}I radiolabeled peptides grafted on glass surface using a γ counter (Massia et al., 1990), XPS quantification (Biltresse et al., 2005) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Sawyer et al., 2005).

We chose to use high-resolution μ -imager, which looks a promising methodology for characterizing activity onto solid surfaces. [^3H]-Lys was chosen in order to mimic the reaction of

RGDC peptides. Indeed, one of the main problems relevant to the application of immobilized biomolecules through functionalization techniques is the bioactivity loss due to (i) the release of the non-correctly grafted molecules and/or (ii) the hydrolysis of the chains.

According to Massia and Hubbell (Massia and Hubbell, 1991a), a surface density of 1 fmol/cm² for GRGDY covalently grafted to the surface of otherwise poorly adhesive glass substrate was sufficient to promote fibroblast cell spreading but focal contact formation was observed only at concentrations of 10 fmol/cm² and higher. Our experiments have shown that when materials are treated in harsh conditions the lysine concentration ($[RGDC]_{UV} = 2.4 \text{ pmol/mm}^2$, $[RGDC]_{HI} = 1.7 \text{ pmol/mm}^2$, $[RGDC]_{Native \text{ oxidized}} = 1 \text{ pmol/mm}^2$, $[RGDC]_{Native \text{ grafted}} = 0.6 \text{ pmol/mm}^2$) is clearly higher than this latter concentration. Moreover, we have a correlation between carboxyl end group and Lysine densities ($[COOH]_{UV} = 240 \text{ pmol/mm}^2$, $[COOH]_{HI} = 160 \text{ pmol/mm}^2$, $[COOH]_{Native \text{ oxidized}} = 70 \text{ pmol/mm}^2$, $[COOH]_{Native \text{ grafted}} = 20 \text{ pmol/mm}^2$). Reaction of lysine on the carboxyl end group can be evaluated at 1%.

However, the behaviour of cells on RGD grafted material depends on the RGD density but also on the type of cells. Results obtained on fibroblasts may be different for osteoblasts or endothelial cells. The efficiency of this new route for biomimetic modifications of polymer surfaces have to be clarified by measuring the adhesion in a serum free medium at 3, 6 and 24 h of human osteoblast progenitor cells.

5. Conclusion

A three-step reaction procedure was developed to attach RGD-containing peptides onto poly(ethylene terephthalate) surface with two different densities in order to study this difference on cell attachment. First, cleaned polymer surfaces were modified, resulting in COOH functionalization. Second, the free carboxylic groups were linked to the hetero-cross-linker: dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloride and *N*-hydroxysuccinimide. Finally, cell-adhesive peptides (linear RGDC) were immobilized onto the resulting surface by means of covalent amide bondings.

Peptide densities and distribution onto polymer surface were determined by a new tool: μ -imager. Amounts obtained were $[RGDC]_{UV} = 2.4 \text{ pmol/mm}^2$, $[RGDC]_{HI} = 1.7 \text{ pmol/mm}^2$, $[RGDC]_{Native \text{ oxidized}} = 1 \text{ pmol/mm}^2$ and $[RGDC]_{Native \text{ grafted}} = 0.6 \text{ pmol/mm}^2$ that is sufficient to enhance cell adhesion but not to establish a link between cell attachment and peptide densities. These densities represent 1% of $-COOH$ concentration onto polymer surface.

This work contains two main perspectives:

- Create materials with lower peptide densities in order to have a more important gap between values and test of cell attachment on these materials.
- Create micro-patterns onto polymer surfaces in order to study the impact of RGD distribution on the cell attachment.

References

- Barthe, N., Coulon, P., Hennion, C., Ducassou, D., Basse-Cathalinat, B., Charpak, G., 1999. Optimization of a new scintillation gas detector used to localize electrons emitted by Tc. *J. Nucl. Med.* 40, 868–875.
- Bartouilh De Taillac, L., Porte-Durrieu, M.C., Labrugere, C., Bareille, R., Amedee, J., Baquey, C., 2004. Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation. *Composites Sci. Technol.* 64, 827–837.
- Biltresse, S., Attolini, M., Marchand-Brynaert, J., 2005. Cell adhesive PET membranes by surface grafting of RGD peptidomimetics. *Biomaterials* 26, 4576–4587.
- Boxus, M.-B., 1996. Chemical essays of End-groups Displayed on the surface of PET films and membranes by radiolabelling. *Polym. Adv. Technol.* 0, 589–598.
- Charon, Y., Laniece, P., Bendali, M., Gaillard, J.M., Leblanc, M., Mastripolito, R., Tricoire, H., Valentin, L., 1991. A self triggered intensified CCD (STIC). Nuclear instruments and methods in physics research section A: accelerators, spectrometers. *Detect. Assoc. Equipment* 310, 379–384.
- Crumeyrole-Arias, M., Jafarian-Tehrani, M., Cardona, A., Edelman, L., Roux, P., Laniece, P., Charon, Y., Haour, F., 1996. Radioimagers as an alternative to film autoradiography for in situ quantitative analysis of I-ligand receptor binding and pharmacological studies. *Histochem. J.* 28, 801–809.
- Deldime, M., Dewez, J.-L., Schneider, Y.-J., Marchand-Brynaert, J., 1995. Reactivity assay of surface carboxyl chain-ends of poly(ethylene terephthalate) (PET) film and track-etched microporous membranes using fluorine labelled- and/or 3H-labelled derivatization reagents: tandem analysis by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and liquid scintillation counting (LSC). *Appl. Surf. Sci.* 90, 1–14.
- Emiko Uchida, Y.U., Yoshito, I., 1993. Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film. *Langmuir* 9, 1121–1124.
- Fechine, 2004. Surface characterization of photodegraded poly(ethylene terephthalate). The effect of ultraviolet absorbers. *Polymer* 45, 2303–2308.
- Hubbell, J.A., 1999. Bioactive biomaterials. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 123–129.
- Hubbell, J.A., Massia, S.P., Desai, N.P., Drumheller, P.D., 1991. Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. *Biotechnology* 9, 568–572.
- Hubbell, J.A., Massia, S.P., Drumheller, P.D., 1992. Surface-grafted cell-binding peptides in tissue engineering of the vascular graft. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 665, 253–258.
- Irvine, D.J., Hue, K.-A., Mayes, A.M., Griffith, L.G., 2002. Simulations of cell-surface integrin binding to nanoscale-clustered adhesion ligands. *Biophys. J.* 82, 120–132.
- Jeon, D.H., 2004. The effect of irradiation on physicochemical characteristics of PET packaging film. *Radiat. Phys. Chem.* 71, 1059–1064.
- Kouvroukoglou, S., Dee, K.C., Bizios, R., McIntire, L.V., Zygourakis, K., 2000. Endothelial cell migration on surfaces modified with immobilized adhesive peptides. *Biomaterials* 21, 1725–1733.
- Laniece, P., Charon, Y., Dumas, S., Mastripolito, R., Pinot, L., Tricoire, H., Valentin, L., 1994. HRRI: A high resolution radioimager for fast, direct quantification in in situ hybridization experiments. *BioTechniques* 17, 338–345.
- Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D.A., Wells, A., Griffith, L.G., 2000. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.* 113, 1677–1686.
- Marchand-Brynaert, J., Deldime, M., Dupont, I., Dewez, J.-L., Schneider, Y.-J., 1995. Surface functionalization of poly(ethylene terephthalate) film and membrane by controlled wet chemistry: chemical characterization of carboxylated surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 173, 236–244.
- Massia, S.P., Hubbell, J.A., 1990. Covalently attached GRGD on polymer surfaces promotes biospecific adhesion of mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 589, 261–270.

- Massia, S.P., Hubbell, J.A., 1991a. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J. Cell Biol.* 114, 1089–1100.
- Massia, S.P., Hubbell, J.A., 1991b. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 25, 223–242.
- Massia, S.P., Stephen, P., Hubbell, J.A., 1990. Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. *Anal. Biochem.* 187, 292–301.
- Pallu, S., Bourget, C., Bareille, R., Labrugere, C., Dard, M., Sewing, A., Jonczyk, A., Vernizeau, M., Christine Durrieu, M., Amedee-Vilamitjana, J., 2005. The effect of cyclo-DfKRG peptide immobilization on titanium on the adhesion and differentiation of human osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 26, 6932–6940.
- Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309, 30–33.
- Porte-Durrieu, M.C., Guillemot, F., Pallu, S., Labrugere, C., Brouillaud, B., Bareille, R., Amedee, J., Barthe, N., Dard, M., Baquey, C., 2004. Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials* 25, 4837–4846.
- Sawyer, A.A., Weeks, D.M., Kelpke, S.S., Mccracken, M.S., Bellis, S.L., 2005. The effect of the addition of a polyglutamate motif to RGD on peptide tethering to hydroxyapatite and the promotion of mesenchymal stem cell adhesion. *Biomaterials* 26, 7046–7056.
- Wang, W., 1999. Two-step photodegradation process of poly(ethylene terephthalate). *J. Appl. Polym. Sci.* 74, 306–310.

Deuxième article

RGD Peptides Grafting onto Poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities: Physico-chemical and biological characterisation

C. Chollet, C. Labrugère, C. Chanseau, A. Guignandon, B. Brouillaud , M.C. Durrieu

Advanced Functional Materials, soumis à la publication

DOI: 10.1002/adfm.200((Please insert last 6 DOI digits))

RGD Peptide grafting onto Poly (ethylene terephthalate) with well controlled densities: Physico-chemical and biological characterisation **

By Céline Chollet, Christine Labrugère, Alain Guigandon, Christel Chanseau and Marie-Christine Durrieu*

New hybrid materials associating poly(ethylene terephthalate) and osteoblast-like cells have been developed thanks to the covalent grafting of RGD containing peptides displaying different densities onto polymer surface. Biomimetic modifications were performed by means of a three-step reaction procedure: creation of COOH functions, coupling agent grafting and finally immobilization of RGD peptides. To validate the various stages of the surface treatment, different techniques physicochemical were used: we used XPS to prove covalent grafting at each stage, toluidine blue and high-resolution μ -imager (using $[^3\text{H}]\text{-Lys}$) to evaluate RGD densities (varying between 0.6 and 2.4 pmol/mm²), AFM and contact angle measurements to characterize respectively roughness and hydrophilicity of materials. Moreover, μ -imager has exhibited the stability of peptides grafted onto the surface when treated in harsh conditions. The efficiency of this new route for biomimetic modification of PET surface was demonstrated by measuring the adhesion of MC3T3 cells and by focal adhesion observation. Results obtained prove that a minimal RGDC density of 1 pmol/mm² is required to improve MC3T3 cells responses. Indeed, cells seeded onto RGD-modified PET with density higher than 1 pmol/mm² were able to establish focal adhesion as visualized by fluorescence microscope compared to cells immobilized onto unmodified PET and RGD-modified PET with densities lower than 1 pmol/mm². Moreover, number of focal contacts is enhanced by the increase of RGD peptides density grafted on the material surface. Thanks to these results, osteoblast-like cells may be successfully associated to RGD-grafted PET to promote cell colonization during development of hybrid materials.

[*] Dr. C. Chollet, C. Chanseau, Dr. M.C. Durrieu
Institut National de la santé et de la recherche médicale, U577,
Bordeaux, F-33076 France ; Université Victor Segalen Bordeaux
2, Bordeaux, F-33076 France 146 rue Léo Saignat, 33076
Bordeaux Cedex, France.
E-mail: marie-christine.durrieu@bordeaux.inserm.fr
Dr. C. Labrugère
Centre de caractérisation des Matériaux Avancés, ICMCB-CNRS;
Université Bordeaux 1, Avenue du docteur Schweitzer, 33608
Pessac, France
Dr. A. Guignandon
Institut National de la santé et de la recherche médicale, U890, St-
Etienne, F-42023 France ; Univ. Jean Monnet, France, F-42023
France, 15 rue Ambroise PARE, 42023 St-Etienne Cedex2,
France

[**] The authors would like to thank B. Desbat for Brewster Angle
Microscopy measurements (Institut des Sciences Moléculaires,
UMR 5255, Université Bordeaux 1, 351 cours de la Libération -
33405 Talence cedex France).

1. Introduction

Polyethylene terephthalate (PET) is widely used for cell culturing (as Thermanox® or Mylar®), surgical suture material, or vascular grafts (as Dacron®) due to its acceptable biocompatibility and because of its desirable properties, such as strength and modulus. Nevertheless, the surface should be improved for good performance in these applications. Indeed, use of Dacron® in vascular surgery present a patency rate of 93% as aortic bifurcation grafts, but its success declines drastically for small diameter vessels. Indeed, PET is not totally an inert material and can be susceptible to chemical attack and hydrolysis that may cause alterations in mechanical properties. Moreover, one important remaining problem is inadequate interactions between PET and cells leading in vivo to foreign reactions. In order to improve interactions between implant and surrounding tissues, a new route consist on association of biomaterials and autologous cell before implantation. However, this hybrid material concept

requires a perfect cooperation between biomaterials and the cells that will colonise it.

A new route is to associate biomaterials with autologous cell populations in culture require perfect cooperation between the biomaterial and the cells that will colonise it. One of the main strategies in this area of research is to make the biomaterials more "attractive" for the tissue or the surrounding cells. To do this, one suitable approach is to functionalise the surface of the materials by "pro-adhesive" ligands likely improve cell adhesion and hence the cell and tissue colonisation of these materials.

A numbers of researchers have focused on the hybridization of synthetic polymers with biologically active molecules in order to produce tissue-compatible materials. Since 1984, the RGD (Arg-Gly-Asp) tripeptide is well known to be the active sequence of adhesive proteins of the extracellular matrix such as vitronectin, fibronectin and collagen [1, 2]. This attachment property is due to the presence of integrin receptors implied in all the cellular adhesion phenomena accordingly [3, 4, 5].

Several parameters could increase the adhesive properties of these peptides towards cells, i.e. their sequence, their conformation, their density and their mode of immobilization onto the substrate. Success of biomimetic materials modifications is mainly governed by the spatial distribution of these bioactive molecules. Much effort is devoted to ensure stability of the peptide bonding and accessibility to active sites through physical adsorption and chemical binding. Physical adsorption may not be successful in promoting long-term implantation because of the risk of desorption and/or exchange [6] or difficulties in controlling the presentation of the active sequence towards target cells. Massia and Hubbell [7], for example, have demonstrated that polymeric surfaces with grafted RGD-peptides were found to exhibit biological activity. They proved that a low density of peptide (1 fmol/cm²) was sufficient to improve fibroblasts spreading. But focal contact formation and normal stress fiber organization were observed at higher density (10 fmol/cm²). More recently, Marchand et al [5, 8, 9, 10] performed PET surface modification and grafting of peptidomimetics in order to study impact of spacer-arm and peptide density. The amounts of peptides obtained varied between 30 pmol/cm² and 100 pmol/cm² [5] and seem improve cell adhesion whatever the peptide density.

However, a clear quantitative correlation between surface density and cell adhesion is not possible due to the different methods used to quantify RGD density. Indeed, previous studies proposed to quantify amount of

grafted peptides: (i) by measuring the activity of radiolabeled PET using scintillation counting, what implies to measure the radioactivity in solution or suspension [5, 10], (ii) ^{125I} radiolabeled peptides grafted on glass surface using a β counter [11], what gives an amount of radioactivity but not peptide distribution on the surface, (iii) XPS quantification [5], what necessitates use of tags, (iv) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [12] what leads useful but only to semiquantitative results. Moreover, a comparison of the influence of the density of RGD peptides on the cellular adhesion can be carried out only when all the other effects which contribute to the cellular adhesion are excluded. That is not the case in all the examples because of the use of various cellular lines, various peptides and various strategies of surface functionalization.

In this paper, we propose an original method to quantify density of RGD peptides grafted onto the surface. This method gives, in one hand the density and in other hand the spatial distribution of ligand on the surface. The aim of this paper is to obtain physico-chemical characterization of RGD modified PET and to correlate these results to cell attachment.

Our study is divided into several parts:

- PET functionalisation with four different RGD densities
- Physico-chemical characterization of grafted materials
 - Evaluation of RGD density
 - Hydrophilicity study
 - Roughness evaluation
- Cell adhesion study
 - Immunofluorescent staining
 - Focal adhesion quantification

2. Results

2.1 Physico-chemical characterization

2.1.1 (1) X-Ray Photoelectron spectroscopy (XPS)

XPS has been used to monitor each reaction step as it can provide information on chemical bonds and atomic concentrations.

Virgin PET (Figure 2) exhibits the expected elements as we can principally detect C and O (Table 1). The C1s spectrum principally shows five components present in PET polymer: COOH at 289.3 eV, O-C=O at 288.40 eV, C-O at 286.19 eV, C(O-C=O) at 285eV and C-C at 284.4 eV (Figure 1 and 2). Bonding proportions are closed to theoretical scheme. The C/O experimental ratio is 2.64 which is not very far from expected theoretical ratio of 2.5 (Table 1). Moreover, differences between theoretical and experimental percentages are due to pollutions like C-C or CHx. In first time, we will focus our analysis on “density3 modification” in order to validate the grafting. In a second time, we will investigate other densities.

Density 3:

Table 1 gives the change in the atomic proportions on the top surfaces. Figures 3 to 8 show the expected grafting steps as well as the corresponding C1s XPS spectra. XPS analysis of hydrolysed PET (Figure 3) shows simultaneously a decrease of C-O and an increase of COOH bounds (Figure 4) that confirms expected surface modification. Moreover, we observe a decrease of C/O ratio.

After NHS grafting (Figure 5), N appears as expected (Table 1). We can observe increase of peak at 287.6 eV which is due to apparition of N-C=O component (figure 6). Moreover, there is an increase of ratio $[C(O-C=O) + N-C=O]/O-C=O$ ($R_{\text{density3-COOH}} = 0.4$, $R_{\text{density3-NHS}} = 0.53$) that confirms grafting of NHS onto the surface. The ratio of Csp2/Csp3 is also modified: $R_{\text{density1-COOH}} = 0.6$, $R_{\text{density3-NHS}} = 0.8$ that proves introduction of cyclic compounds on the polymer.

After peptide grafting (Figure 8), XPS analysis confirm the increase of the nitrogen (Table 1) due to the presence of RGDC peptide onto the surface. This is confirmed by the increase of $[C(O-C=O) + N-C=O]/O-C=O$ ratio ($R_{\text{density3-NHS}} = 0.53$, $R_{\text{density3-RGDC}} = 1$) and COOH/N-C=O ratio ($R_{\text{density3-NHS}} = 0.47$, $R_{\text{density3-RGDC}} = 0.8$) (Figure 8). RGDC grafting is also characterised by a decrease of Csp2/Csp3 ratio ($R_{\text{density3-NHS}} = 0.8$, $R_{\text{density3-RGDC}} = 0.5$) due to the disappearance of the cyclic functions.

XPS analysis of material functionalised by various densities of RGD peptides:

Thanks to the preceding studies, all modifications took place following the theoretical scheme. In this part we will only compare all different

materials (with different peptide densities) and validate grafting only using quantification tables (Table 2, 3 and 4). For the other modifications we can observe the same compartment.

Table 1. Experimental atomic composition (%) obtained by XPS analysis in the case of virgin PET, Density 3-COOH, Density 3-NHS and Density 3-RGDC surfaces.

Atomic %	C	O	N	C/O	C/N
Native PET	72.5	27.5	-	2.64	-
Density 3-COOH	69.5	30.5	-	2.28	-
Density 3-NHS	68.8	28.2	3	2.44	23
Density 3-RGDC	69.5	26.2	4.2	2.65	17

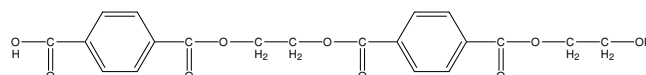


Figure 1. Native Poly(ethylene terephthalate)

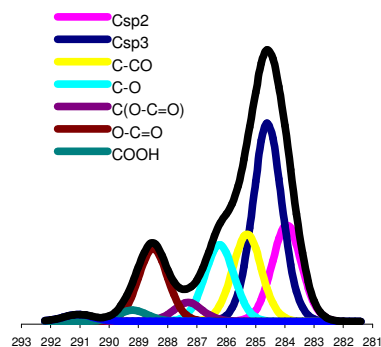


Figure 2. C1s XPS spectra for Native PET

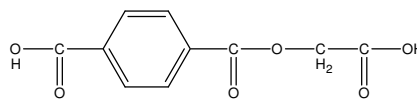


Figure 3. PET hydrolyzed and oxidized, “Density 3-COOH”

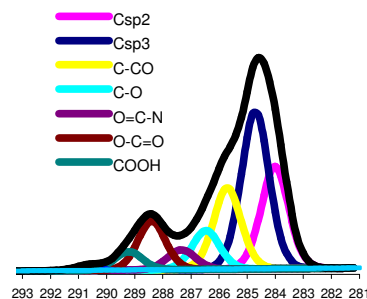


Figure 4. C1s XPS spectra for material Density 3-COOH

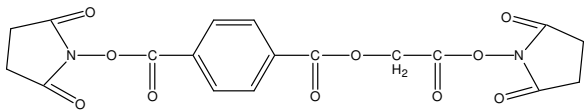


Figure 5. NHS grafted onto PET surface, "Density 3-NHS"

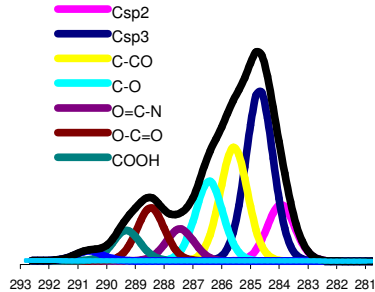


Figure 6. C_{1s} XPS spectra for material Density 3-NHS

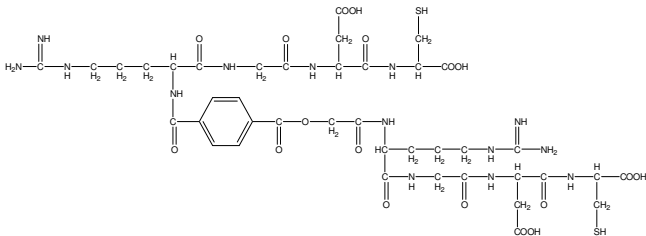


Figure 7. RGDC grafted onto PET surface, "Density 3-RGDC"

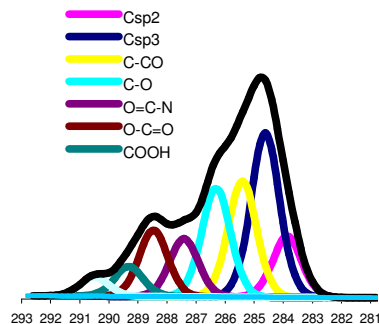


Figure 8. C_{1s} XPS spectra for material Density 3-RGDC

After first modification step, all modified materials exhibit a C/O ratio lower than native polymer (C/O_{density4}= 2.11, C/O_{density3}= 2.28, C/O_{density2}=2.33, C/O_{PET}=2.64) which proves an increase of the oxygen concentration onto material surfaces (Table 2).

After NHS grafting, quantification table (Table 3) shows significant differences in nitrogen percentage for materials. XPS give a semi-quantitative evaluation of NHS density grafted onto the surface, [NHS]_{density4}>[NHS]_{density3}>[NHS]_{density2}>[NHS]_{density1}.

After RGDC grafting, we can see an increase of N percentage compare to previous step, this result is valid for all materials and proves that grafting is efficient in all cases (Table 4). Furthermore, we have an evaluation of RGDC densities grafted onto the surface: [RGDC]_{density4}> [RGDC]_{density3}> [RGDC]_{density2}> [RGDC]_{density1}.

Table 2. Experimental atomic composition (%) obtained by XPS analysis in the case of virgin PET (Density 1-COOH), Density 2-COOH, Density 3-COOH and Density 4-COOH surfaces.

Atomic %	C	O	N	C/O
Density 4-COOH	67.9	32.1	-	2.11
Density 3-COOH	69.5	30.5	-	2.28
Density 2-COOH	70	30	-	2.33
Density 1-COOH = Native PET	72.5	27.5	-	2.64

Table 3. Experimental atomic composition (%) obtained by XPS analysis in the case Density 1-NHS, Density 2-NHS, Density 3-NHS and Density 4-NHS surfaces

Atomic %	C	O	N	C/O	C/N
Density 4-NHS	69.8	26.8	3.4	2.6	20.5
Density 3-NHS	68.8	28.2	3	2.44	22.9
Density 2-NHS	68.7	29.8	1.6	2.3	42.9
Density 1-NHS	68.9	29.8	1.3	2.31	53

Table 4. Experimental atomic composition (%) obtained by XPS analysis in the case Density 1-RGDC, Density 2-RGDC, Density 3-RGDC and density 4-RGDC surfaces

Atomic %	C	O	N	C/O	C/N
Density 4-RGDC	69	26.5	4.6	2.60	15
Density 3-RGDC	69.5	26.2	4.2	2.65	17
Density 2-RGDC	68.8	27.1	4.1	2.53	16
Density 1-RGDC	68.1	28.4	3.5	2.40	19

2.1.2. Toluidine Blue

Toluidine blue was used to evaluate the density of COOH created onto (i) PET surface after first step of the RGD grafting procedure (Figure 24, 3 and 9), (ii) as well as onto PET surface after NHS grafting (Figure 9) (Figure 24, 5 and 9) [13]. Nevertheless, This technique didn't permit an RGD quantification after last grafting step (Figure 24 and 7) because of its detection limit.

On one hand, Toluidine blue staining shows an increase of -COOH functions onto PET surface after first modification step (Figure 24) comparatively to virgin polymer (Density 1-COOH). On the other hand, decrease of COOH density after NHS grafting (Figure 24, step2) proves NHS is covalently grafted by COOH functions (Figure 5) onto PET surface. Moreover, Toluidine blue method permit us to estimate NHS density grafted onto PET surface:

$$[\text{NHS}]_{\text{density4}} > [\text{NHS}]_{\text{density3}} > [\text{NHS}]_{\text{density2}} > [\text{NHS}]_{\text{density1}}$$

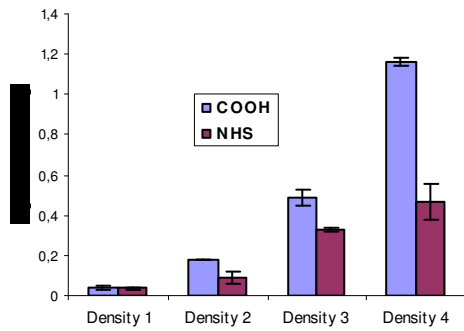


Figure 9. Semi-quantitative evaluation of COOH density onto PET-COOH and PET-NHS surfaces

2.1.3. Brewster angle microscopy (BAM) measurements

For RGDC layer onto polymer Brewster angle was evaluated at 60.2° and $n=1.7$. These indications permitted us to estimate the RGDC layer thickness at 1.5 nm.

2.1.4. High resolution micro-imager

As described in previous works [13], peptides concentration was estimated by grafting 3H-Lys instead of RGDC peptides and hence measuring activity A (in cpm/mm²) of the as-treated materials by high-resolution micro-imager. Materials are then treated in harsh conditions, by sonicating in water during 1 hour before each analysis, in order to observe a possible decrease of peptides amount (Figure 10). Initial decrease observed of activity represents adsorbed and coated peptides. However after 600 h of washing we observed a stage, we can then say that RGDC concentration obtained represent only grafted molecules. Densities obtained varied between 0.6 and 2.4 pmol/mm² according to the treatment used. Moreover, high resolution μ -imager gives an information about radiolabelled amino acids distribution on the surface and proves homogeneity of grafting.

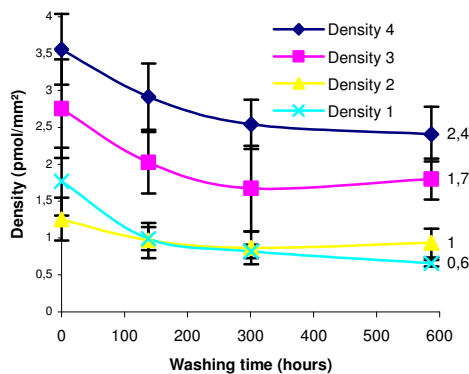


Figure 10. RGD peptide density after washing in harsh conditions

2.1.5. Atomic Force Microscopy (AFM)

Surfaces topography of various functionalized materials was observed by AFM (topography and phase contrast images) (Figures 11, 12, 13, 14 and 15) (Table 5). AFM images show that on the RGD grafted PET surface, the peptide appeared homogeneously distributed whatever the grafting treatment. A mean roughness of $R_a = 2$ nm is obtained in the case of “Density 1-RGDC” modification and a maximal roughness of 6.2 nm in the case of “Density 3-RGDC” modification. In contrast, the native PET presents a roughness of $R_a = 1.3$ nm. Excluded for “density 4 modification”, the more important the density of peptides is on the surface, the more important the roughness is (table 5).

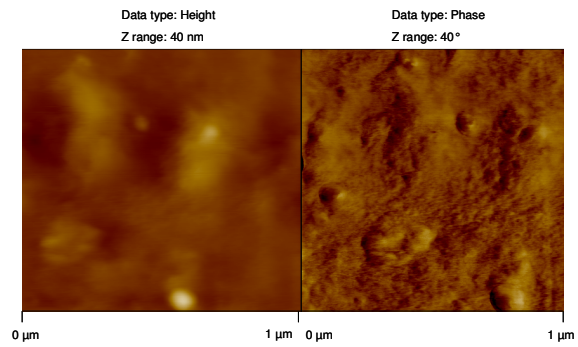


Figure 11. AFM pictures of Native PET

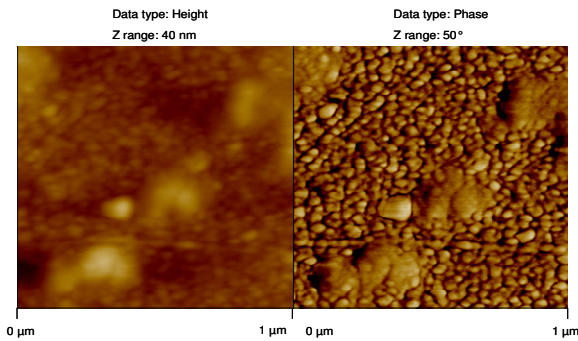


Figure 12. AFM pictures of PET grafted with RGDC peptides, Density 1-RGDC.

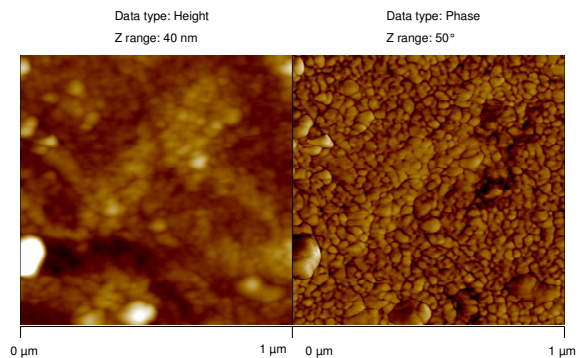


Figure 13. AFM pictures of PET grafted with RGDC peptides, Density 2-RGDC.

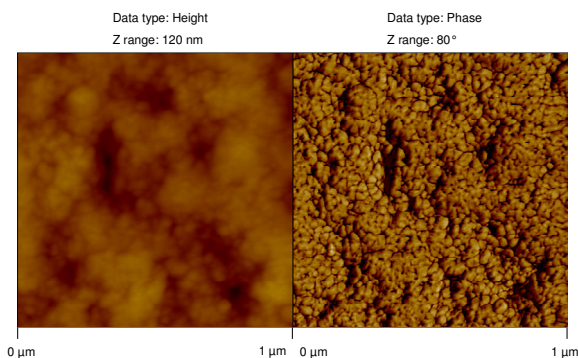


Figure 14. AFM pictures of PET grafted with RGDC peptides, Density 3-RGDC.

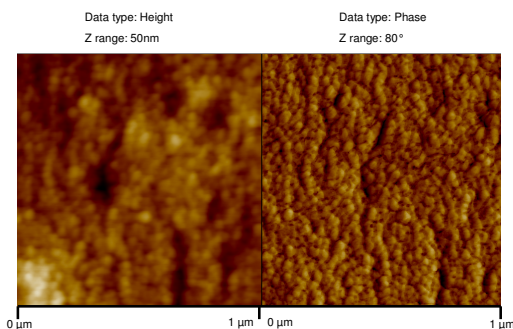


Figure 15. AFM pictures of PET grafted with RGDC peptides, Density 4-RGDC.

Table 5. Roughness obtained from Native PET and PET grafted with RGDC peptides

Sample	RGDC density (pmol/mm ²) [13]	Ra (nm)
Virgin PET	-	1.3
Density 1-RGDC	0.6	2
Density 2-RGDC	1	2.8
Density 3-RGDC	1.7	6.2
Density 4-RGDC	2.4	3.7

2.1.6. Wetting properties

Contact angle measurement is used to validate RGD grafting by evaluation of surface materials hydrophilicity after last modification step (Figure 1, 8 and 17). Systematically, RGD peptides grafting whatever the density involves a reduction in the value of the contact angle. This is explained by the presence of -COOH and -NH₂ functions on PET surface after RGD peptides grafting.

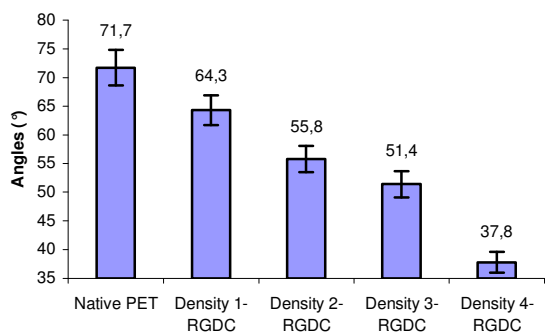


Figure 16. Contact angles measurements for Native PET and PET grafted with RGDC peptides

2.2. Biological evaluation

2.2.1. Cell attachment

These quantitative results reveal that RGDC peptides constitute a good ligand to increase the cell adhesion at short times (7h). They show that more the RGD peptides density is important onto the surface the more amount of cells attached is important (Fig.18) except for, density 1 which doesn't seem to improve cell adhesion.

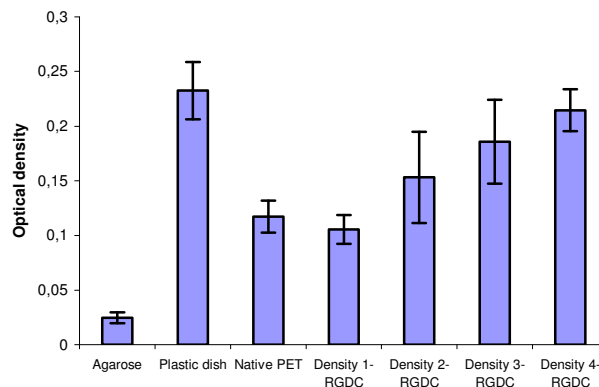


Figure 17. Attachment of MC3T3 7h after seeding in serum free medium onto agarose, Plastic dish, native PET, PET-RGD density 1, PET-RGD density 2, PET-RGD density 3 and PET-RGD density 4

2.2.2. Fluorescent staining

Fluorescent staining of F-actin and DNA is used to study MC3T3 attachment onto native PET and modified PET surfaces (Fig.19).

Fig.19 shows differences in cell adhesion as function of surfaces modification as we observed a higher number of nucleus (i.e. cells) per field for PET-RGDC surfaces as compared to Native PET. Onto PET surface (Fig.19-a) cells are not spread and start to form agglomerates. Fig.19 (b) and (c), which represent respectively PET-RGDC-density 1 and PET-RGDC-density2, shows a limited initial adhesion nevertheless PET-RGDC-density2 presented a full spread morphology as well as cells seeded on PET-RGDC-density 3 and PET-RGDC-density 4 (Fig.19-d and e). These observations are in agreement with results obtained in cell attachment assay (Fig.18) and with quantification of cell area (fig. 20).

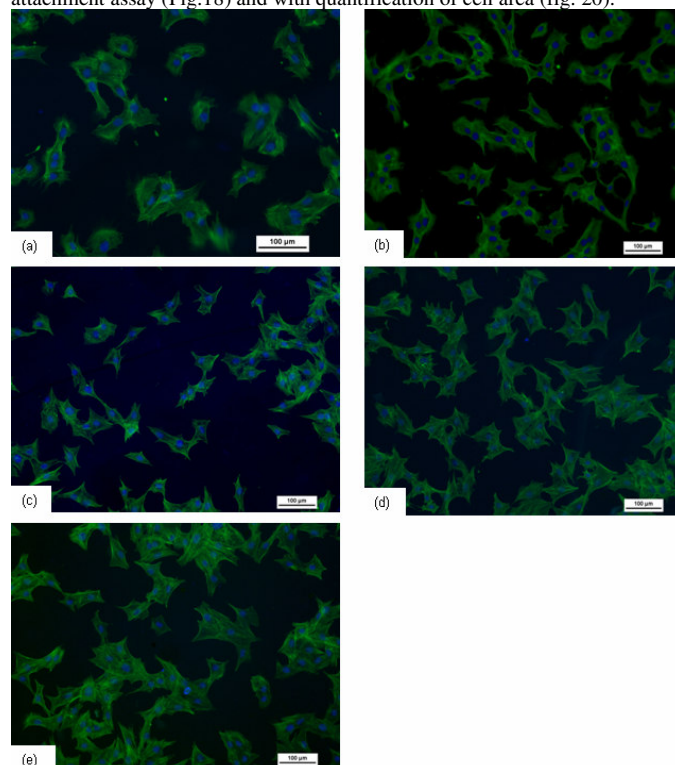


Figure 18. Fluorescent staining 7h after seeding of F-actin and DNA for materials: (a) Native PET, (b) PET-RGDC-density 1, (c) PET-RGDC-density 2, (d) PET-RGDC-density 3 and (e) PET-RGDC-density 4.

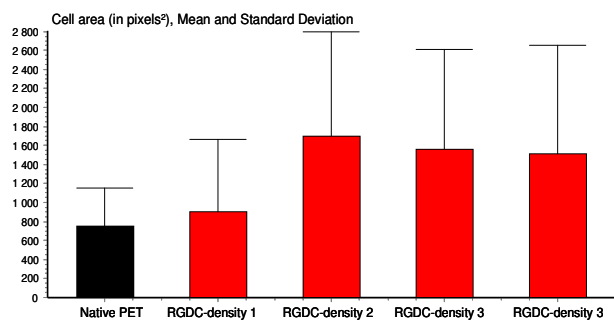


Figure 19. Cell area onto Native PET, PET-RGDC-density 1, PET-RGDC-density 2, PET-RGDC-density 3 and PET-RGDC-density 4.

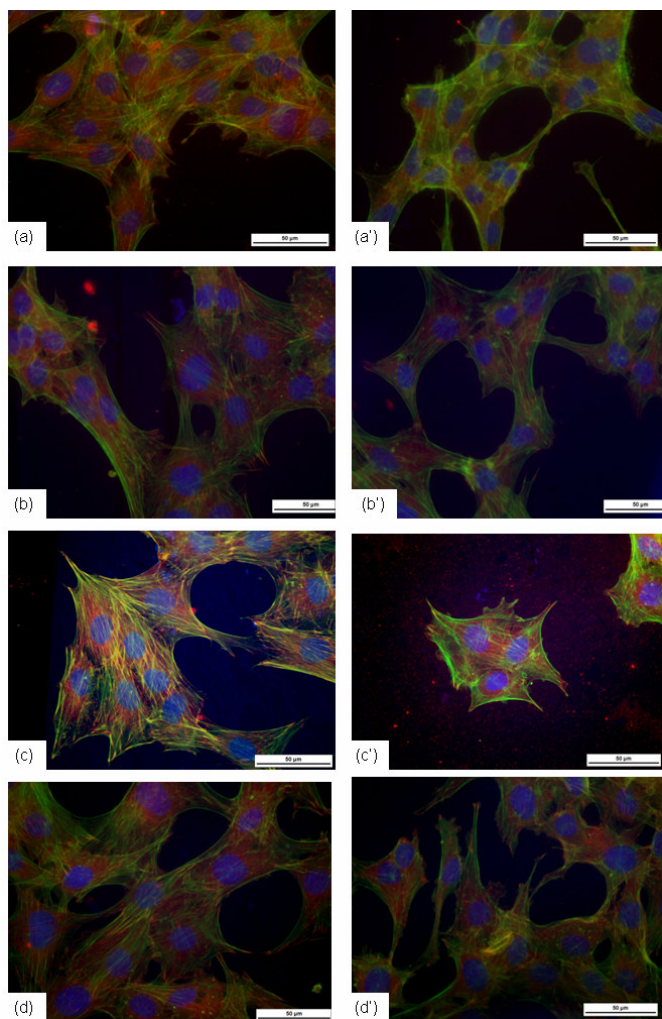


Figure 20. Fluorescent staining of F-actin, Vinculin and DNA for materials: (a) PET-RGDC-density 1, (a') PET-RGEC-density 1, (b) PET-RGDC-density 2, (b') PET-RGEC-density 2, (c) PET-RGDC-density 3, (c') PET-RGEC-density 3, (d) PET-RGDC-density 4 and (d') PET-RGEC-density 4.

Fig.21-a, -b, -c and -d show respectively immunostaining of F-actin, vinculin and DNA for materials: PET-RGDC-density 1, density 2, density 3 and density 4. In order to be sure that cell adhesion is due to RGDC grafting on the surface, we used PET-RGEC instead of PET-RGDC as negative control. Fig.21-a', -b', -c' and -d' represent respectively PET-RGEC-density 1, density 2, density 3 and density 4. PET-RGDC-density 1 (Fig.21-a) and PET-RGEC-density 1 (Fig.21-a') don't seem to exhibit any focal adhesion, in agreement with results obtained previously (Figure 18 and 19-b). However in the case of PET-RGDC-density 2 (Fig.21-b), density 3 (Fig.21-c) and density 4 (Fig.21-d), we can see an organization of actin cytoskeleton accompanied by a vinculin clustering. However, in the case of PET grafted with RGEC (Fig.21-b', -c' and -d'), any actin organisation and vinculin clustering was observed, and this whatever the

density of RGEC. These results indicate that attachment observed in the case of PET-RGDC is due to a specific adhesion between RGD and cells integrins.

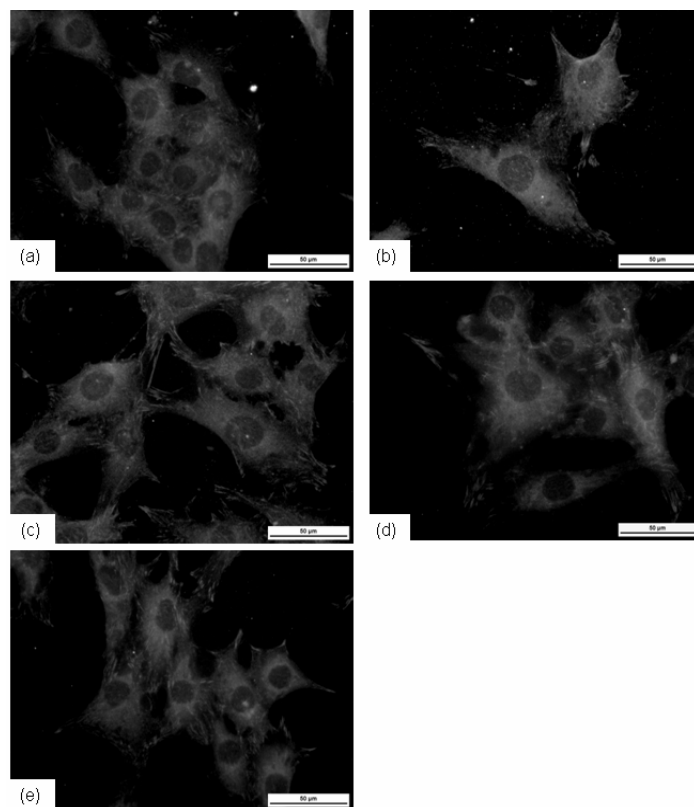


Figure 21. Fluorescent staining of vinculin for materials: (a) Native PET, (b) PET-RGDC-density 1, (c) PET-RGDC-density 2, (d) PET-RGDC-density 3 and (e) PET-RGDC-density 4.

Fig.22-a, -b, -c, -d and -e show respectively immunostaining of vinculin in the case of native PET, PET-RGDC-density 1, PET-RGDC-density 2, PET-RGDC-density 3 and PET-RGDC-density 4. Fig.22-a and 22-b present any difference in focal adhesion between native PET and PET-RGDC-density 1. However, Fig.22-c, 22-d and 22-e present a high number of focal contacts that is in agreement with results obtained previously (Fig.18 to 21).

2.2.3. Focal adhesion quantification

In order to obtain quantitative data on cell adhesion, we used an image analysis program [14] to appraise cell by cell adhesion parameters such as cell area, number and relative area of contacts. We used vinculin to qualify stable focal contacts involved in cell adhesion. We first observed that for native PET and low density of RGDC (density 1) focal contacts appeared as diffuse structures but were clustered for higher densities of RGDC (Fig.22). The number of clusters was counted and we observed a significant increase of the number of contact per cell for PET-RGDC-density3 and -4 (Fig.23). This result indicated that focal contact formation and stabilisation was increased on high densities of RGDC. We found that cell area was significantly increased for the 3 highest densities of peptides as compared to control or density1 (Fig.20), furthermore relative area of vinculin positive contacts was significantly increased for PET-RGDC-density 3 and -4 as compared to other conditions (Fig.24).

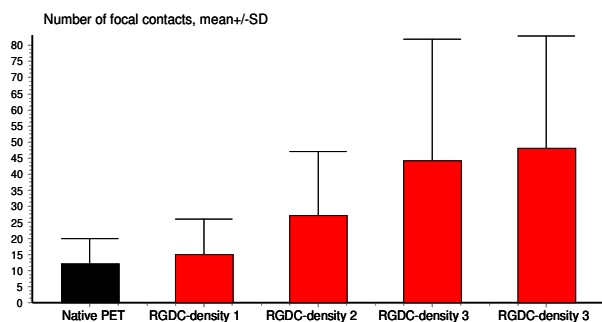


Figure 22. Number of focal contacts on Native PET, PET-RGDC-Density 1, PET-RGDC-Density 2, PET-RGDC-Density 3 and PET-RGDC-Density 4.

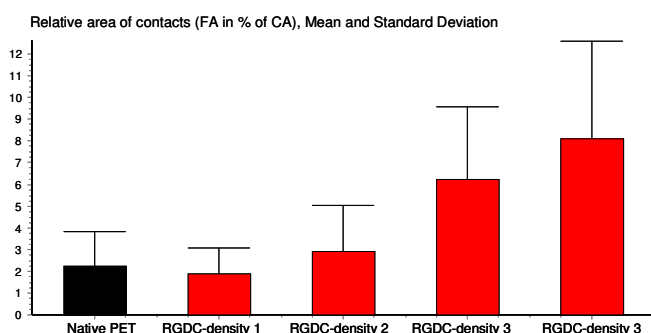


Figure 23. Relative area of contacts (Focal contact area in % of Cell area) on Native PET, PET-RGDC-Density 1, PET-RGDC-Density 2, PET-RGDC-Density 3 and PET-RGDC-Density 4.

3. Discussion

Bone or vascular substitution materials currently used in surgery present, in long term applications, a random success due to the lack of biointegration in surrounding tissues. One important remaining problem is inadequate interactions between biomaterial and cells, leading in vivo to foreign reactions, such as inflammation, infections, aseptic loosening, local tissue waste, and implant encapsulation as well as thrombosis and embolization.

In order to improve these interactions between implant and cells, a new route consist on association of biomaterials and autologous cell before implantation that requires a perfect cooperation between biomaterials and the cells that will colonise it. One of the main approaches to improve biomaterials is to modify their surface by immobilization of cell recognition motives to obtain controlled interactions between cells and synthetic substrates.

Nowadays, the RGD sequence is by far the most effective and the most often employed peptide sequence for stimulated cell adhesion on synthetic surfaces. Indeed, since 1984, RGD-containing peptides have been used to improve the qualities of the cell culture supports, either by coating, or by covalent grafting [2]. However, number of studies demonstrated that a stable linking of RGD peptides to the surface was essential to promote strong cell adhesion, because formation of focal contacts only occurs if the ligands withstand the cells contractile forces [15]. In order to provide a stable linking RGD peptides should be covalently attached to the surface via functional groups like hydroxyl-, amino- or carboxyl- groups.

Today, number of studies has proved that immobilization of adhesive peptides on materials enhances endothelial [7, 11, 16, 17, 18, 19, 20] and osteoblast [20, 21, 22, 23] cells adhesion. But, from the early days of RGD mediated cell adhesion there has been an ongoing discussion about how many RGD molecules are required to induce not only cell attachment but also cell spreading and focal contact formation. A kind of benchmarking results were obtained by Massia and Hubbell, who found a minimal amount of as low as 1 fmol RGD peptide/cm² sufficient for cell spreading

and as low as 10 fmol/cm² sufficient for formation of focal contacts and stress fibers on a RGD functionalized glycophase glass surface [24]. Since this day generally higher amounts of RGD peptides have been reported to be necessary to achieve the same cell behavior on polymers [25, 26]. For example, Marchand et al [5, 8, 9, 10] performed PET surface modification and grafted peptidomimetics in order to study impact of spacer-arm and peptide density. Amounts of peptides obtained varied between 30 pmol/cm² and 100 pmol/cm² [5], but a clear quantitative correlation between surface density of peptidomimetics and cell adhesion has not been established. However, a comparison of the influence of the density of RGD peptides on the cellular adhesion can be carried out only when all the other effects which contribute to the cellular adhesion are excluded. That is not the case in all the examples because of the use of various cellular lines, various peptides, various strategies of surface functionalization and various methods used for density quantification.

This paper purposed to functionalize polyethylene terephthalate surfaces by mean of covalent grafting RGDC peptides with different well controlled densities and to study osteoblast-like cell response in culture on such surfaces. All modifications were accompanied by a meaningful physico-chemical characterization and peptides densities quantification.

3.1. Surface functionalization:

As indicated above, a strong anchoring of RGD peptides on surfaces is required to improve cell adhesion and favorise focal contact formation. In this study we chose to work with poly(ethylene terephthalate) (PET), resulting from polycondensation between terephthalic acid and ethylene glycol.

We propose here the use of various techniques of surface fonctionnalisation with an aim of obtaining well controlled densities of RGD peptides onto the surface.

Indeed, there are several ways to functionalize PET in order to create anchoring sites on its surface. PET can be modified by track-etching by heavy atoms (Ar⁹⁺) to generate a mixture of carboxyl and hydroxyl group terminated chain ends. These can either be treated with sodium borohydride to obtain uniform hydroxyl functionalization or they can be oxidized to only obtain carboxylic acid end groups [10, 27].

In most cases RGD peptides are linked to polymers via a stable covalent amide bond, usually done by reacting an activated surface carboxylic acid group with the nucleophilic N-terminus of the peptide. Thus we focused our surface functionalisation on the creation of carboxylic groups in order to covalently graft RGD peptides on the PET surface. In agreement with previous researcher results, four different surface modifications were used to obtain carboxylic acid end groups in various quantities onto PET surface (figure 1).

Because of its mode of polymerisation, PET already contains a mixture of carboxyl and hydroxyl group termed end chains: "density 1" modification is based on the RGD containing peptide anchorage onto carboxyl end groups.

Hydroxyl end groups were converted in carboxyl groups to increase anchorage sites onto PET surface: "density 2" is the RGD peptides grafting onto carboxyl groups resulting from oxidation of hydroxyl end groups.

Treatment by wet chemistry, e.g. hydrolysis of PET to obtain surfaces identical to those create by track-etching, is often used for PET modifications [8]: "density 3" resulting from grafting of RGD containing peptides onto hydrolysed and then oxidized PET surfaces.

According to photodegradation mechanisms of PET reported by other researchers, UV irradiation processes induced carboxyl and hydroxyl groups formation that suggested cleavage of the main chain of PET [28, 29]: "density 4" resulting from the grafting of RGD containing peptides onto photodegraded and oxidized PET surfaces.

The two following stages were the grafting of coupling agent and the immobilization of RGDC peptides onto PET-COOH surfaces [13].

3.2. Surface characterization:

In this study, much effort has been devoted to ensure stability of the peptide bonding and accessibility to active sites through chemical binding. Thus, we chose to graft covalently RGDC peptides onto PET with different well controlled densities in order to promote cell adhesion.

Several physico-chemical techniques were used to characterize materials after each modification steps.

3.2.1. Step 1

First step consists on surface modification in order to create $-COOH$ functions on the surface by mean of four different modifications [13] (Fig.1). After the first step, XPS results show an increase of $COOH$ bounds, whatever the modification, that confirm expected surface modifications (Table 2). Moreover, these results can be correlated to Toluidine Bleu staining (Fig.10) [13] that prove the efficiency of these methods to obtain a gradient of $-COOH$ densities: $[COOH]_{density4} > [COOH]_{density3} > [COOH]_{density2} > [COOH]_{density1}$.

3.2.2. Step 2

Second step consist on coupling agent grafting on the carboxylic groups. In the same way that previously, XPS was used to validate the grafting on the surface. For all materials, NHS grafting step is characterised by apparition of N component in XPS quantification tables (Table 3). These results are also confirmed by Toluidine blue staining which show a decrease of $-COOH$ density after NHS grafting. The sensibility of Toluidine blue staining didn't permit to conclude about NHS grafting on Density 1 material. However, the presence of NHS molecule on density 1 material was already confirmed by XPS analysis. Moreover, Density 4 material present very important $-COOH$ decrease in comparison with other material.

In conclusion, this staining gives a semi-quantitative estimation of NHS density grafted on the surface very close from XPS values: $[NHS]_{density4} > [NHS]_{density3} > [NHS]_{density2} > [NHS]_{density1}$.

3.2.3. Step 3

The last step consist on grafting RGD containing peptides onto polymer surface. At this stage, all surface modifications induced by peptides grafting had to be determined in order to understand cell behaviour on such surfaces.

Like previously, XPS was used to validate the immobilization of RGDC peptides onto PET surface. XPS analysis shown an decrease of C/N ratio compare to previous step, this result is valid for all materials and proves grafting is efficient in all cases. Also, the atomic percentage of nitrogen detected on the PET surface enabled to make a semi-quantitative evaluation of the peptide grafting onto the polymer surface (table 4): $[RGDC]_{density4} > [RGDC]_{density3} > [RGDC]_{density2} > [RGDC]_{density1}$. XPS results were confirmed by contact angle measurements, used to study surface hydrophilicity of surface materials after RGDC grafting (Figure 17). Indeed, RGD peptides grafting involves systematically (whatever the density) a reduction in the value of the contact angle with respect of virgin PET. However, the more important decrease was observed for Density 4-RGDC material. This is explained taking into account the appearance of $-COOH$ and $-NH_2$ functions onto the surface of material, so, more the value of the contact angle decreases more the density of peptides on the surface increases.

The main purpose of this work was to quantify RGDC densities grafted onto the surface in order to correlate these densities with cell adhesion. Taking into account the very low thickness of grafting RGDC layer (1.5 nm determined by Brewster Angle measurements), XPS is not sufficient to evaluate its surface density. The analyzed depth takes the polymer substrate as well. It's the reason why fitted XPS spectra don't permit to conclude precisely about different RGDC densities onto PET surface.

To quantify RGDC density grafted on the surface, we chose to use high-resolution μ -imager, which looks a promising methodology for characterizing activity onto solid surfaces [30]. $[^3H]$ -Lys was chosen in order to mimic the reaction of RGDC peptides onto PET. Indeed, one of the main problems relevant to the application of immobilized biomolecules through functionalisation techniques is the bioactivity loss due to (i) the release of the non-correctly grafted molecules and/or (ii) the hydrolysis of the chains. Our results show that peptide density obtained by various methods used varied between 0.6 and 2.4 pmol/mm² (Fig.11) [13]. So, our experiments have shown that when materials are treated in harsh conditions the lysine concentration stays at about 1000 times greater than concentrations found by Massia and Hubbell [24]. Even if we have to consider that RGD containing peptides occupy a greater steric hindrance

than single Lysine amino acid, the peptide distribution obtained in this work would be sufficient to induce the focal contact formation and allow a strong cell adhesion.

Moreover, Atomic force Microscopy (AFM) gives us informations about homogeneity of grafting onto PET surface (Fig.13-16). Indeed, AFM images show that on the RGDC grafted PET surfaces, the peptide appeared homogeneously distributed whatever the modification treatment. Changes in roughness induced by surface modifications varied between $R_a = 2$ nm (PET-RGDC-density 1) and $R_a = 6.2$ nm (PET-RGDC-density 3) (Table 5). In contrast, the native PET presents a roughness of $R_a = 1.3$ nm. Excepted for "density 4 modification", the more important the density of peptides is on the surface, the more roughness is important (table 5).

Results obtained by Toluidine blue staining (Figure 10), contact angle measurements (Figure 17) and AFM analysis (Figure 16) prove that UV treated material (density 4 modification) doesn't present the same behavior as chemically modified material (density 1, 2 and 3 modifications). Indeed, numerous studies demonstrated that the main effect of PET UV-induced photodegradation was CO and carboxylic acid production. These modification can be mainly attributed to a Norrish type I process followed by decarbonylation and to a Norrish type II process involving a cyclic six-membered transition state [31].

Thus, based upon these physico-chemical results, it seems reasonable to say that RGDC peptide grafting effectively takes place following the theoretical scheme with densities varying between 0.6 and 2.4 pmol/mm².

3.3. Biological evaluation:

In this paper, we propose to study influence of PET surfaces grafted with well controlled RGDC densities on MC3T3-E1 cells behaviour in vitro. Cell attachment assay performing 7h after seeding in serum free conditions shows that the peptide immobilization onto PET resulted in improvement of MC3T3 attachment in the case of materials presenting a RGDC density higher than 0.6 pmol/mm² (Fig.18). In agreement with these results, immunostaining of F-actin and nucleus show an increase in the number of adherent cells on modified surface (Fig.19-a, -b, -c and -d) in comparison with native polymer (Fig.19-e). However, cell compartment correlates RGDC densities immobilized on the surface. Indeed, two groups seem to appear: (i) PET-RGDC-density 1 & 2 show a small increase in adherent cell number compare to native PET but do not allow complete cell spreading, (ii) PET-RGDC-density 3 & 4 induce complete cell spreading, formation and stabilisation of contacts, supports for actin stress fibres formation.

However, cell adhesion can be due to physico-chemical modifications induced during chemical treatments and not only to RGDC grafting on the surface [32]. Indeed, numerous studies proved the effect of roughness [33, 34, 35] and hydrophilicity [36] of surface on cell adhesion. A grafting procedure using PET-RGEC instead of PET-RGDC as negative control was used (Fig.21). The comparison of RGEC and RGDC at high density indicated that no clustered vinculin contacts are formed and no stress fibres are detectable on PET-RGEC surface. These results prove that attachment observed in the case of PET-RGDC is due to a specific adhesion between RGD and cells integrins.

Vinculin-positive contact quantification analyses demonstrated that high densities of RGDC favoured formation and stabilisation of contacts. Clusterisation of contact is critical for recruitment of protein kinases within contact such as FAK, src and their activities are necessary for cell survival [37] and proliferation [38].

All biological results prove that our functionalizing strategy constitute a good route to improve cell adhesion and enhance focal adhesion formation. The cells behaviour appears clearly different according to the density of RGD peptides grafted onto the PET surface.

Indeed, cell adhesion assay and focal adhesion quantification show that cell responses depend of RGDC density grafted on the surface. Moreover, these results seem to indicate that the critical RGDC density to increase cell attachment is 1pmol/mm², that is higher than minimal density found by Massia and Hubbell [24]. However, in their studies Massia and Hubbell grafted GRGDY peptides onto poorly adhesive glass substrates and observed human foreskin fibroblasts adhesion. Moreover, they used iodination of tyrosine (125I-Tyr) coupled with \square counter analysis to evaluate peptide density on the surface but this technique didn't permit them to conclude about homogeneity of their grafting. Thus, it's not

possible to compare our results with those obtained in their studies because of the use of different cells, different peptides, different substrate and different peptides quantification technique.

Moreover, the high peptide density necessary to increase cell adhesion can be explained by the lack of bioactivity of the RGDC peptide, used in this study as model peptide. Indeed, RGD is the minimal peptidic sequence known to enhance cell adhesion, but bioactivity is different for each sequence: RGD < RGDS < GRGDSP [2] et for each conformation. Indeed, some of us have studied adhesion of Human Osteoblast Progenitor cells on Ti-6Al-4V grafted with linear RGDC and cyclo(DfKRG) peptides [23]. 24 hours after seeding, cyclo(DfKRG) grafted material induced an higher increase of cell adhesion than RGDC grafted material. These results suggest that cyclo(DfKRG) peptide constitute a better ligand for cell adhesion than linear peptides. Another study [39] have shown that linear GRGDSP linear peptide interacts preferentially with $\alpha\beta 1$ intergins while cyclo-DfKRG peptides interacts with $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ integrins. Consequently, different cell adhesion at 24h seeding may be linked to the different cellular activity, as extracellular proteins synthesis, implied by the signal transduction pathways that both RGD-containing peptides induce, respectively. In addition, cell adhesion behaviour has to be related to the accessibility of integrins receptors by the peptides displaying conformation.

4) Conclusions

New hybrid materials associating poly(ethylene terephthalate) and osteoblast-like cells have been developed thanks to the covalent grafting of RGD containing peptides displaying different densities (varying between 0.6 and 2.4 pmol/mm²) onto polymer surface. Benefits of the as-proposed methods were related to control of RGDC peptides densities grafted onto the surface as well as to their stability onto the surface when treated in harsh conditions. The efficiency of this new route for biomimetic modifications of PET surface was also clarified by the capacity of RGDC peptide to induce focal contact formation and osteoblasts adhesion at 7h. However, cell attachment assay and focal contact observation permit to prove that a minimal RGDC density of 1pmol/mm² is required to improve MC3T3 cells responses. Indeed, PET grafted with 0.6 pmol/mm² doesn't induce increase of cell adhesion and focal contact formation. Nevertheless, different materials exhibiting densities between 0.6 and 1pmol/mm² will have to be elaborate in order to find the critical density value.

5. Experimental

The PET sample used is a commercial film obtained from Goodfellow, France. It is in the form of bi-oriented film with a thickness of 75 μ m. Inorganic reagents (NaOH, KMnO₄, H₂SO₄, HCl) were obtained by Sigma, France. Acetonitrile, Dimethylaminopropyl-3-EthylCarbodiimide hydrochloride (EDC), N-HydroxySuccinimide (NHS) and 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES buffer) were obtained from Aldrich, France. RGDC and RGEC peptides were obtained from Bachem, France. [³H]-L-Lysine solution with 150mCi/mmol was purchased from Amersham, France. Antibodies provided from Molecular Probes and DAPI (4,6-Diamidina-2-phenylin) from Sigma, France.

5.1. Surface preparation of PET and covalent grafting of RGDC peptide with COOH anchore

Polymer surfaces were modified according Boxus and al. [8] with some modifications. The peptide immobilization strategy has been performed following this procedure (Fig.24), also described in previous works [13]:

1) First, materials were modified in order to create COOH functions onto PET surface. Protocols are different for each density. Nomenclature used for treatment 1, treatment 2, treatment 3 and treatment 4 are respectively density 1, density 2, density 3 and density 4:

- Density 1-COOH
 - PET is used without modification.
- Density 2-COOH
 - PET is oxidized by KMnO₄ in H₂SO₄ (1.2 N) during 1 h at 60°C. After reaction, PET is rinsed one time with HCl (6 N, 10

min) and two times in MilliQ water (2*10 min), then samples dried on Whatman paper.

- Density 3-COOH
 - PET is hydrolysed with 0.25 g NaOH, 25 ml H₂O, 25 ml acetonitrile during 15 h at 60°C.
 - PET is oxidized by the same way than density 2.
- Density 4-COOH
 - PET is modified by UV irradiation during 60 h on each face [29, 40, 41].PET is oxidized by the same way than density 2.

2) PET-COOH (whatever the treatment) were immersed in a solution of Dimethylaminopropyl)-3-EthylCarbodiimide hydrochloride (EDC, 0.2 M) + N-HydroxySuccinimide (NHS, 0.1 M) in (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES buffer, 0.1 M in MilliQ Water) and then rinsed in MilliQ Water. Materials obtained are named: density 1-NHS, density 2-NHS, density 3-NHS and density 4-NHS.

3) The immobilization of cell-binding peptides containing the RGD sequence or Lysine, was realized in a solution of RGDC ((or 3H-Lysine)/H₂O (C=10-3 M)) in the case of micro-imager study) for 15 h at room temperature. After grafting, the disks were rinsed every time with MilliQ Water during one week. Materials obtained are named: density 1-RGDC, density 2- RGDC, density 3- RGDC and density 4- RGDC.

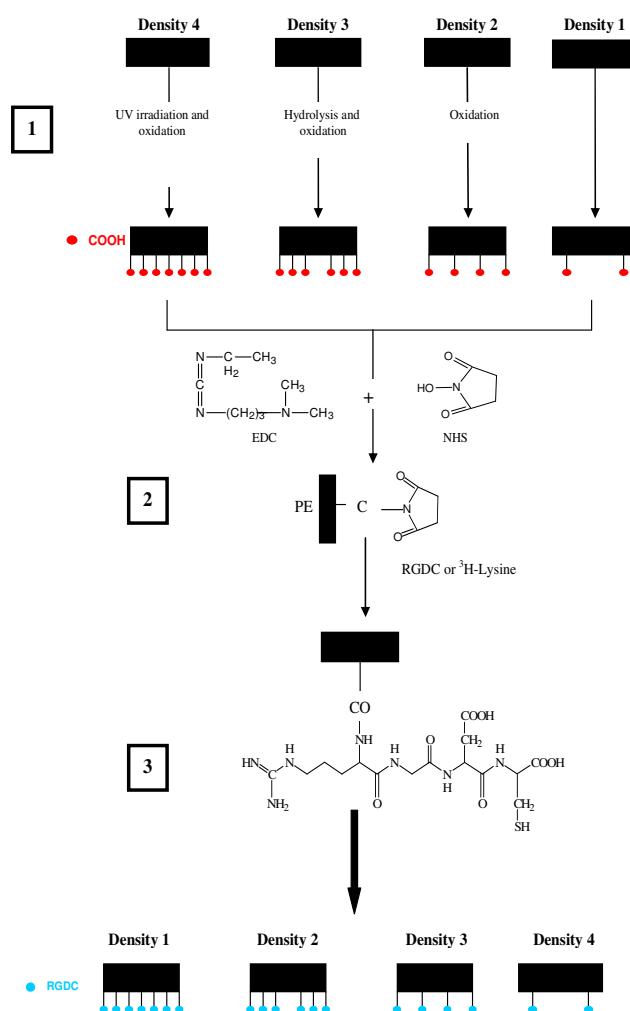


Figure 24. Sequence of the PET surface modification procedure. (1) PET surface preparation in order to obtain -COOH end chains, (2) reaction with Dimethylaminopropyl)-3-EthylCarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-HydroxySuccinimide (NHS), (3) Immobilization of RGDC or 3H-Lysine containing peptide through amine bounding.

5.2. Surface characterisation

5.2.1. X-Ray Photoelectron spectroscopy (XPS)

A VG Scientific ESCALAB photoelectron spectrometer was used for the surface analysis with a non-monochromatized MgK 1253.6 eV source of 100 W. The area of the analytical X-ray spot on the sample surface is about 250 microns. A flood gun was used for charge compensation. Acquisition of high-resolution spectra was done at constant pass energy of 20 eV. Fitting was then realized with software provided by VG Scientific, each spectrum being referenced to carbon pollution at 284.8 eV. Binding energies values are given with a precision of ± 0.2 eV. Analysis were performed with $n=3$ samples (3 points per sample).

5.2.2. Toluidine blue

After the reaction, the amount of COOH functions grafted onto the film was determined using the Toluidine Blue-O (TBO) method, in which the dye stains the deprotonated acid groups through ionic interaction [42]. In brief, a solution of 5×10^{-4} M TBO was prepared by dissolving TBO powder in NaOH solution (pH 10). Modified PET disc was placed in a 10 ml tube. Ten millilitres of TBO solution were added on the PET surface and the sample was shaken for 6 h. After TBO binding, the supernatant was removed from tube and the stained PET surface was washed with NaOH solution (pH 10) and pure water for two times. Five millilitres of 50% acetic acid was added to remove the TBO dye from the carboxyl groups on PET during 10 minutes. Two hundred microlitres of the washed solution from each sample was loaded into 96 well plate and the optical density at 633 nm is measured with a 96 well-plate reader. The density of the carboxyl groups is determined with a calibration plot containing several samples with different carboxyl group concentrations. The calculation is based on the assumption that 1 mol of TBO has complexed exactly with 1 mol carboxyl groups.

5.2.3. Brewster angle microscopy (BAM) measurements

The RGDC layer grafted onto polymer were evaluated using a Brewster angle microscope (NFT BAM2plus, Göttingen, Germany) mounted on the Langmuir trough. The microscope was equipped with a frequency doubled Nd:Yag laser (532 nm, 50 mW), polarizer, analyser and a CCD camera. The spatial resolution of the BAM was about 2 μm , and the image size 625 \times 400 μm with $\times 10$ lens used.

5.2.4. Atomic Force Microscopy (AFM)

The surface roughness was analysed by Atomic Force Microscope (AFM) (Dimension 3100, Veeco), by tapping mode.

5.2.5. Wetting properties

The contact angles of water droplets on the different surfaces were measured using a DIGITROP goniometer of the GBX Society, France. Static water contact angles were measured by depositing, on the virgin PET surface and on the modified PET surface, a droplet of deionised water. 30 measurements were done for each sample of PET (2 materials for each condition).

5.2.6. High resolution micro-imager

Micro imager was developed at the Institute of Nuclear Physics IN2P3-CNRS-ORSAY France [30] and is based on contact imaging through a solid scintillation sheet.

The basic principle of these detector is detailed elsewhere [30, 43]. When an emitted β - particle or an electron interacts with the detection medium, part of their energy is converted into light. The corresponding light spots are recorded by an electronic system composed of an intensified Charge Coupled Device (CCD) camera, an interface board and a PC. The count and localization by a centroid calculation of each light distribution creates the quantitative cartography of the activity in the sample. The characteristic of the light emitted, which is analysed during the acquisition, depends on the energy of the particle. This property suggests new potential applications in the field of β -rays selection according to their energy.

The full field of view permits spatial resolution around 15 μm for 3H and 20 μm for 14C and 35S. Quantitatively, peptides density was evaluated by grafting 3H-Lysine instead of RGDC peptide (fig.1). Radiolabeled lysine grafting was performed incubating (Fig.1, step 3 of the chemical procedure) PET samples in a solution of 3H-Lys diluted in Lysine solution

(10–3 M). Radioactivity of this latter solution was adjusted to 6 $\mu\text{Ci/ml}$. Before each analysis, materials are treated in harsh condition by sonicating in water during 1 hour. To evaluate the stability of grafted Lysine in water, the 3H activity (in cpm/mm²) was calibrated at each analysis. Calibration of the entire probed area was first done stating the signal corresponding to the activity of 14C standard slides to a constant level. The 3H radioactive decay wasn't finally taken into account since its half-life (14 years) is negligible vs. the experiments duration.

5.3. Cell culture

5.3.1. Cell culture

MC3T3-E1 (osteoblast-like) cells are a non-transformed cell line established from newborn mouse calvaria and exhibit an osteoblastic phenotype. Cells were grown in Alpha-MEM medium supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 1% l-glutamine. Cells were subcultured once a week using trypsin/EDTA and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

5.3.2. Cell attachment

Cell attachment was measured by a modified colorimetric method according to Landegren with some modifications [44]. Disks of functionalized polymer were sterilised during 10 min in 70% ethanol and then rinsed three times in PBS. They were placed in 24-wells tissue culture plates (Corning) that had been previously coating with 2% agarose. MC3T3 cells were seeded at a density of 100 000 cells/cm² on each material and allowed to attach for 7h at 37 °C in serum-free α -MEM medium. Then, non-adherent cells were removed by washings with PBS 0.1 M pH 7.4. Chromogenic substrate solution of 500 μl (7.5 mM substrate (p-nitrophenyl N-acetyl β -D glucosaminide); 0.1 M Na citrate; pH=5; 5% (v/v) Triton-X 100) was added for 2 h at 37°C in humidified atmosphere. Reaction was stopped with 5 mM EDTA/50 mM glycine pH 10.4. Resulting chromophore was measured spectrophotometrically at 405 nm. The positive and negative controls of cell adhesion were the tissue culture polystyrene (TCPS) and agarose (2%) coating, respectively.

5.3.3. Morphological study: focal contacts formation

(a) fluorescent staining: F-actin filaments, Vinculin and DNA

Fluorescent staining was performed 7 h after cell seeding at a density of 30 000 cells/cm². Cell loaded materials were rinsed twice with serum free medium, fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) during 15 min at 4°C, and permeabilized with permeabilizing buffer pH= 7.2 (10.3% (w/v) sucrose + 0.292% (w/v) NaCl + 0.06% (w/v) MgCl₂ + 0.476% (w/v) Hepes buffer + 0.5% (v/v) triton-X-100) during 15 min at 4°C. Cell cytoskeletal filamentous actin (F-actin) was visualized treating the cells with 5 U/mL Alexa Fluor® 488 phalloidin for 1 h at 37°C. Vinculin was visualised treating the cells with 1% (v/v) Monoclonal anti-vinculin (clone hVIN-1 antibody produced in mouse) during 1 h at 37°C. Then we coupled with Alexa fluor® 568 (F(ab')₂ fragment of rabbit anti-mouse IgG(H+L)) during 30 min at room temperature. Cell nuclei were counterstained with 20 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (4,6-Diamidina-2-phenylin) during 10 min at room temperature. Samples were finally mounted in Vectashield® (Vector). In order to be sure that adhesion is RGD specific, the negative control consist on material grafted with RGEC.

(b) Focal adhesion quantification

For quantification of vinculin positive contacts areas, we used the freeware image analysis ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). We opened the raw image, converted it to an 8-bit file, and used the unsharp mask feature (settings 1:0.2) before removing the image background (rolling ball radius 10). After smoothing, the resulting image, which appears similar to the original photomicrograph but with minimal background, was then converted to a binary image by setting a threshold. Threshold values were determined empirically by selecting a setting, which gave the most accurate binary image for a subset of randomly selected photomicrographs with varying peptides densities. Cell area was determined by manual delineation on raw fluorescent images, total contact area and mean contact area per cell were calculated by "Analyse Particules" in Image J, contacts smaller than 3 pixels were not taken into account. A minimum of 30 cells per conditions were analysed [14].

(c) Statistics

Statistical analysis was performed using the STATISTICA software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). One way analysis of variance (ANOVA) was performed on focal contacts quantification data. When F values for a given variable were found to be significant, the sequentially rejecting Bonferroni-Holm test [45] was subsequently performed using the Holm's adjusted p-values taken from the t table. Results were considered to be significantly different at $p < 0.05$.

-
- [1] J.A. Hubbell, *Current Opinion Biotechnology*, 1999, 10:123-9.
 - [2] M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature*, 1984, 309(5963):30-3.
 - [3] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials*, 2003, 24(24):4385-415.
 - [4] Y. Ito, M. Kajihara, Y. Imanishi, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1991, 25(11):1325-37.
 - [5] S. Biltresse, M. Attolini, J. Marchand-Brynaert, *Biomaterials*, 2005, 26(22):4576-87.
 - [6] D.G. Castner, B.D. Ratner, *Surface Science*, 2002, 500(1-3):28-60.
 - [7] S.P. Massia, J.A. Hubbell, *Ann New York Acad Sci*, 1990, 589:261-70.
 - [8] T. Boxus, J. Marchand-Brynaert, *Polymer for advanced Technologies*, 1996, 0:589-98.
 - [9] M. Deldime, J.-L. Dewez, Y.-J. Schneider, J. Marchand-Brynaert, *Applied Surface Science*, 1995, 90(1):1-14.
 - [10] J. Marchand-Brynaert, M. Deldime, I. Dupont, J.-L. Dewez, Y.-J. Schneider, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1995, 173(1):236-44.
 - [11] S.P. Massia, P. Stephen, J.A. Hubbell, *Analytical Biochemistry*, 1990, 187(2):292-301.
 - [12] M.V. Sefton, A. Sawyer, M. Gorbet, J.P. Black, E. Cheng, C. Gemmell, et al., *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, 55(4):447-59.
 - [13] C. Chollet, C. Chanseau, B. Brouillaud, M.C. Durrieu, *Biomolecular Engineering*, 2006, to be published.
 - [14] N. Singh, X. Cui, T. Boland, S.M. Husson, *Biomaterials*, 2007, 28(5):763-71.
 - [15] D. Choquet, D.P. Felsenfeld, M.P. Sheetz, *Cell*, 1997, 88(1):39-48.
 - [16] M.C. Porté-Durrieu, C. Labrugère, F. Villars, F. Lefebvre, S. Dutoya, A. Guette, et al., *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999, 46(3):368-75.
 - [17] S.P. Massia, J.A. Hubbell, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1991, 25(2):223-42.
 - [18] S.P. Massia, J.A. Hubbell, *J Biol Chem*, 1992, 267(20):14019-26.
 - [19] J.A. Hubbell, S.P. Massia, N.P. Desai, P.D. Drumheller, *Biotechnology*, 1991, 9(6):568-72.
 - [20] S. Pallu, C. Bourget, R. Bareille, C. Labrugere, M. Dard, A. Sewing, et al., *Biomaterials*, 2005, 26(34):6932-40.
 - [21] M.C. Durrieu, S. Pallu, F. Guillemot, R. Bareille, J. Amedée, *Journal of materials science: materials in medicine*, 2004, 15:779-86.
 - [22] L. Bartouilh de Taillac, M.C. Porte-Durrieu, C. Labrugere, R. Bareille, J. Amedee, C. Baquey, *Composites Science and Technology*, 2004, 64(6):827-37.
 - [23] M.C. Porte-Durrieu, F. Guillemot, S. Pallu, C. Labrugere, B. Brouillaud, R. Bareille, et al., *Biomaterials*, 2004, 25(19):4837-46.
 - [24] S.P. Massia, J.A. Hubbell, *Journal of Cell Biology*, 1991, 114:1089-100.
 - [25] J.A.H. Diane L. Hern, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, 39(2):266-76.
 - [26] B.K. Brandley, R.L. Schnaar, *Developmental Biology*, 1989, 135(1):74-86.
 - [27] J. Marchand-Brynaert, *Biomaterials*, 1999, 20(19):1773-82.
 - [28] T.M. Yasuhide Nakayama, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1995, 29(10):1295-301.
 - [29] S.H. Lee, B.S. Kim, S.H. Kim, S.W. Choi, S.I. Jeong, I.K. Kwon, et al., *J Biomed Mater Res A*, 2003, 66(1):29-37.
 - [30] M. Crumeyrolle-Arias, M. Jafarian-Tehrani, A. Cardona, L. Edelman, P. Roux, P. Laniece, et al., *Histochemical Journal*, 1996, 28(11):801-9.
 - [31] Z. Zhu, M.J. Kelley, *Polymer*, 2005, 46(20):8883-91.
 - [32] K. Anselme, M. Bigerelle, *Acta Biomaterialia*, 2005, 1(2):211-22.
 - [33] L. Montanaro, C.R. Arciola, D. Campoccia, M. Cervellati, *Biomaterials*, 2002, 23(17):3651-9.
 - [34] D.W. Hamilton, D.M. Brunette, *Biomaterials*, 2007, 28(10):1806-19.
 - [35] I. Degasne, M.F. Baslé, V. Demais, G. Huré, M. Lesourd, B. Grolleau, et al., *Calcified Tissue International*, 1999, 64(6):499-507.
 - [36] J.L. Dewez, V.V. Berger, Y.J. Schneider, P.G. Rouxhet, *J Colloid Interface Sci*, 1997, 191(1):1-10.
 - [37] J.W. Triplett, F.M. Pavalko, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(5):C909-21.
 - [38] N. Boutahar, A. Guignandon, L. Vico, M.H. Lafage-Proust, *J Biol Chem*, 2004, 279(29):30588-99.
 - [39] S. Verrier, S. Pallu, R. Bareille, A. Jonczyk, J. Meyer, M. Dard, et al., *Biomaterials*, 2002, 23(2):585-96.
 - [40] G.J.M. Fechine, M.S. Rabello, R.M. Souto Maior, L.H. Catalani, *Polymer*, 2004, 45(7):2303-8.
 - [41] W. Wang, *Journal of applied polymer science*, 1999, 74:306-10.
 - [42] Y.U. Emiko Uchida, and Yoshito Ikada, *Langmuir*, 1993, 9(4):1121-4.
 - [43] N. Barthe, P. Coulon, C. Hennion, D. Ducassou, B. Basse-Cathalinat, G. Charpak, *Journal of Nuclear Medicine*, 1999, 40(5):868-75.
 - [44] U. Landegren, *Journal of Immunological Methods*, 1984, 67(2):379-88.
 - [45] H. Backdahl, G. Helenius, A. Bodin, U. Nannmark, B.R. Johansson, B. Risberg, et al., *Biomaterials*, 2006, 27(9):2141-9.

ARTICLES 3 ET 4

**INFLUENCE DE LA DISTRIBUTION DES PEPTIDES RGD EN
SURFACE DE BIOMATERIAUX SUR L'ADHESION
CELLULAIRE**

Introduction

Comme nous avons pu le voir dans les deux premiers articles, l'immobilisation de ligands pro-adhésifs est très utilisée pour améliorer la biocompatibilité des implants. Cependant, comme cela a été présenté dans la partie bibliographique, la réalisation de microstructures à la surface des biomatériaux constitue également une voie prometteuse pour contrôler les interactions matériaux-cellules (Cf. Chapitres III-A-3 : « Microstructuration de la surface » et IV : « Micro- et nano-distribution de biomolécules en surface de biomatériaux »). En effet, les cellules en conditions naturelles répondent, par le biais de la matrice extracellulaire, à une grande variété de stimuli. Ces derniers s'organisent à des échelles micro- et nano-métriques et peuvent modifier les fonctions cellulaires ou la structure tissulaire. Ceci permet d'expliquer le fait que l'on observe généralement des dérives de phénotypes ou des différences structurales dans le cas des cellules cultivées *in vitro* sur des substrats synthétiques comparativement aux cellules dans leur environnement naturel.

C'est pour cette raison que depuis plusieurs années les chercheurs issus de la biologie, de la chimie et de la science des matériaux ont uni leurs connaissances afin de réaliser des surfaces combinant à la fois l'immobilisation de biomolécules et la réalisation de microstructures en surface de biomatériaux dans le but de reconstituer au mieux l'environnement naturel des cellules. La capacité de contrôler la répartition spatiale des molécules chimiques ou biologiques à la surface d'un matériau a ainsi ouvert de nouvelles perspectives dans la recherche biomédicale. Ces recherches ont donné lieu au développement de nombreuses techniques de micro- et nano-fabrication, initialement utilisées dans l'industrie électronique, ayant pour but de générer l'immobilisation de biomolécules sous forme de microstructures.

L'objectif de ces travaux était de réaliser des micro-domaines de peptides RGD en surface de PET par le biais de deux techniques différentes et d'étudier, dans les deux cas, l'influence de la distribution des peptides sur l'adhésion de cellules ostéoblastiques.

↳ Le troisième article, « *RGD micro-patterning on Poly(ethylene terephthalate) surfaces* » (*ITBM-RBM, 2007 ; 28 (1) : 2-12*), propose :

- La mise au point de 2 méthodes permettant la distribution de peptides RGD : la photolithographie et la photoablation : La microscopie électronique à balayage, la microscopie optique et la profilométrie optique ont permis de valider l'obtention des motifs attendus théoriquement.
- La caractérisation physico-chimique des domaines obtenus : l'imagerie bêta haute résolution est utilisée pour valider la microdistribution des peptides RGD en surface du PET.

↳ Le quatrième article, « *RGD peptides grafted onto micro-patterned Poly(ethylene terephthalate): influence of peptide distribution on osteoblast cells attachment* » (*Biomaterials, soumis*), propose l'évaluation biologique des matériaux réalisés par le biais des deux méthodes :

- La microscopie optique et la microscopie électronique à balayage sont utilisées pour observer l'adhésion des cellules (MC3T3) sur les différents domaines formés par ablation laser.
- La microscopie optique et la microscopie à fluorescence, après l'immunomarquage de l'actine et de l'ADN, sont utilisées pour observer l'adhésion des cellules (MC3T3) sur les différents domaines obtenus par photolithographie.

↳ Les principaux résultats ayant été obtenus dans ces deux articles sont :

- Cette étude a permis de démontrer la faisabilité de développement de matériaux en PET comportant des micro-domaines de peptides RGD à leur surface, et ce, par deux techniques différentes.

- L'imagerie β haute résolution couplée à l'utilisation d'acides aminés radiomarqués (^3H -Lysine) a (i) permis de valider le greffage des peptides dans les domaines obtenus par photolithographie, (ii) prouvé l'ablation des peptides durant l'irradiation au laser à excimères.
- Les différentes techniques utilisées pour observer l'adhésion des cellules sur les surfaces micro-structurées ont montré un alignement des cellules dans les zones contenant les peptides RGD, et ce quelque soit la taille des domaines ou la technique de microfabrication utilisée.
- Le meilleur alignement cellulaire a été obtenu pour des domaines de RGD présentant une largeur de $100\mu\text{m}$ et un espacement entre les motifs variant de 75 à $100\mu\text{m}$.

Troisième article

RGD micro-patterning on Poly(ethylene terephthalate) surfaces

C. Chollet, S. Lazare, C. Labrugère, F. Guillemot, R. Bareille, M.C. Durrieu
ITBM-RBM, 2007 ; 28 (1) : 2-12

Original article

RGD peptides micro-patterning on poly(ethylene terephthalate) surfaces

Réalisation de microdomaines de peptides RGD à la surface de polytéréphtalate d'éthylène

C. Chollet^{a,*}, S. Lazare^b, C. Labrugère^c, F. Guillemot^a, R. Bareille^a, M.C. Durrieu^a

^a *Inserm U577, université Victor-Segalen-Bordeaux-II, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France*

^b *Laboratoire de physicochimie moléculaire (LPCM), UMR 5803 du CNRS, université de Bordeaux-I, 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France*

^c *Centre de caractérisation des matériaux avancés, ICMCB-CNRS, avenue du Docteur-Schweitzer, 33608 Pessac, France*

Received 23 November 2006; accepted 16 March 2007

Available online 29 May 2007

Abstract

The aim of this study was to evaluate the impact of RGD micro-patterned poly(ethylene terephthalate) (PET) on human osteoblast progenitor (HOP) cells attachment. Biomimetic modifications were performed by means of a four-step reaction: surface hydrolysis, oxidation in order to create COOH functions, coupling agent grafting (EDC, NHS) and finally immobilization of peptides. In addition to homogeneous or statistically distribution of peptides, micro-patterns of RGD were generated by: optical photolithography and UV excimer laser ablation. Modification steps were validated by physico-chemical techniques: XPS was used to prove covalent grafting at each stage of the surface functionalization, toluidine blue assay and high resolution μ -imager (using [3H]-Lys) to evaluate peptide densities and validate micro-patterns formation. Finally, the efficiency of this biomodification of PET was demonstrated onto homogeneous surfaces by measuring the adhesion between 1 and 24 h of osteo-progenitor cells isolated from HBMSC.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Le principal objectif de ce travail est d'évaluer l'impact du greffage de peptides RGD sous la forme de microdomaines à la surface du polytéréphtalate d'éthylène (PET) sur l'attachement des cellules ostéoprogénitrices humaines. La biomodification est une réaction en quatre étapes : hydrolyse de la surface, oxydation ayant pour but de créer des fonctions COOH à la surface du polymère, greffage d'un agent de couplage et greffage du peptide. L'originalité de ce travail est basée sur les deux différentes techniques utilisées pour créer les domaines sur le polymère : la photolithographie optique et de l'ablation par laser UV à excimère. Toutes les étapes de modification de surface sont validées par différents moyens de caractérisation physico-chimiques : l'XPS pour valider le greffage covalent des biomolécules en surface du PET, le bleu de toluidine et la micro-imagerie haute résolution pour évaluer la quantité de peptides greffés ainsi que leur répartition en surface. L'efficacité de cette biomodification est démontrée sur les surfaces greffées de façon homogène en mesurant l'adhésion d'ostéoprogéniteurs humains entre 1 et 24 h.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Biomaterial; Grafting; Micro-patterning; RGD

Mots clés : Biomatérial ; Greffage ; Microdomaines ; RGD

* Corresponding author.

E-mail address: celine.chollet@bordeaux.inserm.fr (C. Chollet).

1. Introduction

Several tools have been developed to study the role of signaling in cell biology. Two basic technologies are used to spatially organized cells: control over surface chemistry to render specific regions adhesives [1–3] or non-adhesives [4], and the ability to pattern this chemistry onto a surface [5]. Chemical patterns have attracted substantial interest for applications in the field of biosensors, fundamental cell–surface interaction studies, tissue engineering, and biomaterials [6]. Tremendous effort has been put in by many research groups to develop techniques that are compatible for patterning biomolecules on micrometer scale. Currently, the most widely used techniques are photolithography and soft lithographic approaches such as contact microprinting [7,8], microfluidic patterning [9,10], and micromolding [11]. More recently techniques using AFM, such as deep pen lithography [12] and scanning probe lithography [13] were developed because of their high resolution even in nanometer scale.

Associating biomaterials with autologous cell populations in culture requires perfect cooperation between the biomaterial and the cells that will colonize it. One of the main strategies in this area of research is to make the biomaterials more “attractive” for the tissue or the surrounding cells. To do this, one suitable approach is to functionalize the surface of the materials by “pro-adhesive” ligands likely improve cell adhesion and hence the cell and tissue colonization of these materials. Indeed, when hybrid biomaterials are produced, the current consensus, agreed by many research teams throughout the world is to distribute the bioactive ligands in a controlled fashion in the form of nanoscale clusters or nanodomains and no longer in a homogeneous or a statistically based way.

In this paper we will focus our study on the grafting of RGD (Arg-Gly-Asp) peptides, well known to enhance cell adhesion since 1984 [14]. This attachment property is due to the presence of integrin receptors implied in cellular adhesion phenomena. Massia and Hubbell [15] have shown that at very low RGD peptides densities, fibroblasts attach but do not spread while at higher densities (1 fmol/cm²), i.e. when the spacing between peptides reaches 440 nm, they do. Furthermore, when the RGD density reaches 10 fmol/cm² (corresponding to a spacing of at least 140 nm), focal contact formation (small region on the surface of the fibroblast that is anchored to the substrate) and normal stress fiber organization were demonstrated. More recently, interest of clustering peptides on focal contact formation has also been clarified [16].

Basically, our study was:

- functionalizing and characterizing PET with RGD peptide;
- studying cell adhesion on homogeneous surfaces;
- creating and characterizing micro-patterns onto PET surface.

In this study, we developed two methods to pattern RGD onto PET with different approaches:

- in one hand, domains were created by photolithography and then RGD were grafted in obtained patterns;
- in the other hand, RGD were grafted homogeneously onto polymer surface and then removed according to a predetermined design by UV excimer laser ablation.

2. Materials and methods

2.1. Material

The PET sample used is a commercial film (amorphous Mylar[®] D) obtained from Dupont Teijin. It is in the form of bi-oriented film with a thickness of 75 μm. Inorganic reagents (NaOH, KMnO₄, H₂SO₄, HCl) were obtained by Sigma, France.

Acetonitrile, dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS) and (2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES buffer) were obtained from Aldrich, France. RGDC peptides were obtained from Bachem, France. [³H]-L-lysine solution with 150 mCi/mmol was purchased from Amersham, France. S1818 positive tone photoresist resin and Microposit Developer were obtained from Shipley, France.

2.2. Methods

2.2.1. RGD peptide grafting onto poly(ethylene terephthalate) (PET)

2.2.1.1. Surface preparation of PET and RGDC grafting. PET film was subjected to ethanol washing and sonicating for purification before use. The three subsequent modification steps are (Fig. 1): hydrolyze with NaOH + water/acetonitrile; oxidation with KMnO₄ in H₂SO₄ (step 1); NHS, EDC grafting (step 2); RGDC or ³H-lysine grafting (step 3) [17,18].

2.2.1.2. Surface characterization. Toluidine blue. After the reaction, the amount of COOH grafted onto the film was determined using the toluidine blue-O (TBO) method according to Emiko Uchida and Ikada [19] with some modifications, in which the dye stains deprotonated acid groups through ionic interaction. The concentration of the carboxyl groups is determined from a calibration curve containing several samples with different acetic acid concentrations [18].

X-ray photoelectron microscopy: XPS. A VG Scientific ESCALAB photoelectron spectrometer was used for the surface analysis with a non-monochromatized AlKα 1486.6 eV source of 100 W. The area of the analytical X-ray spot on the sample surface is about 250 μm. A flood gun was used for charge compensation. Acquisition of high resolution spectra was done at constant pass energy of 20 eV. Fitting was then realized with software provided by VG Scientific, each spectrum being referenced to carbon pollution at 284.8 eV. Binding energies values are given with a precision of ± 0.2 eV.

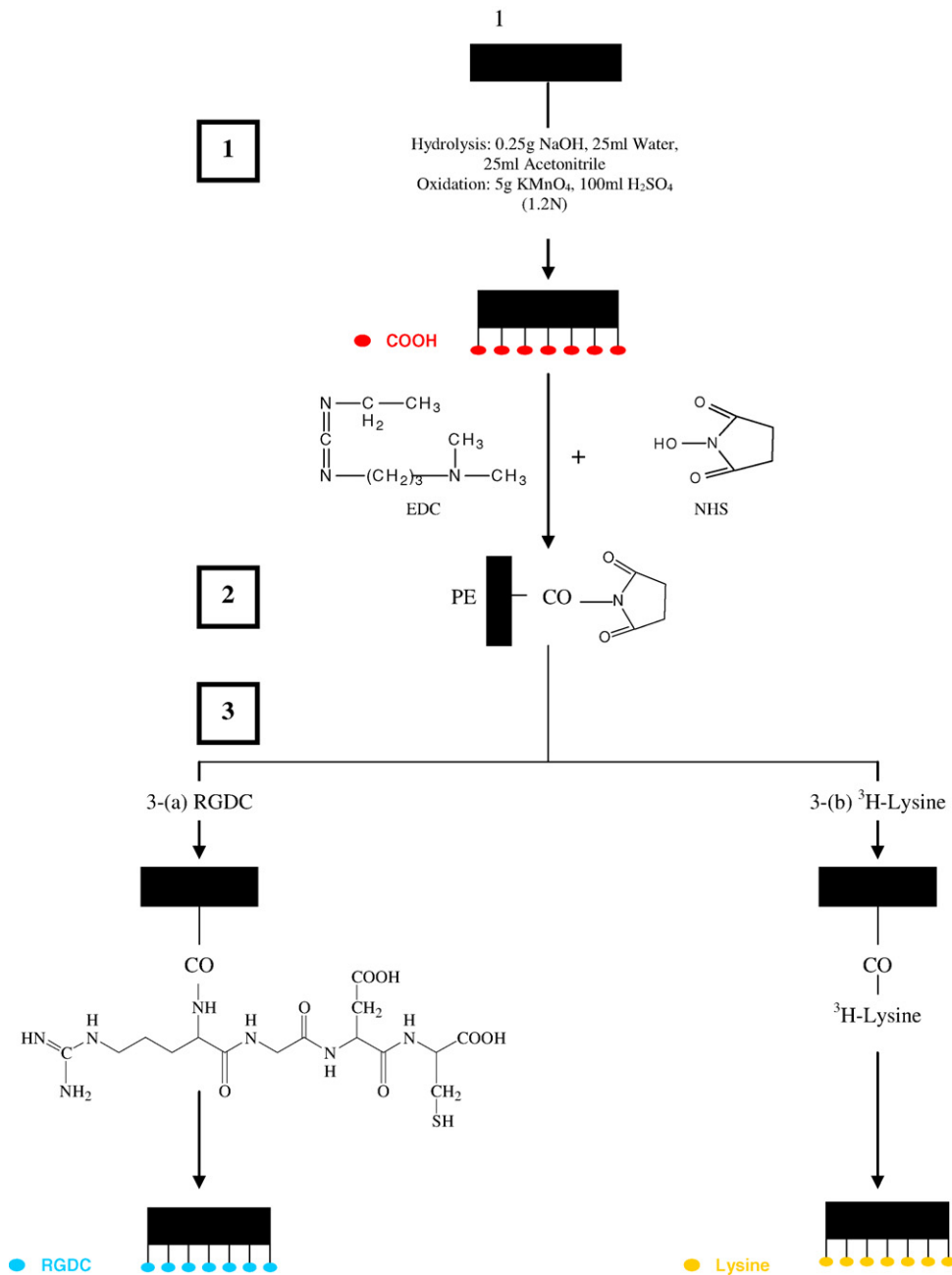


Fig. 1. Sequence of the PET surface modification procedure. (1) PET surface preparation in order to obtain -COOH end chains, (2) reaction with dimethylaminopropyl-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS), (3) immobilization of RGDC or ³H-lysine containing peptide through amine bonding.

2.2.1.3. Cell culture. Human osteoblast progenitor (HOP) cells were isolated from HBMSC according to Vilamitjana-Amédée et al. [20] with some modifications. Briefly, human bone marrow was obtained by aspiration from the iliac crest of healthy donors (20–70 years) undergoing hip prosthesis surgery after traumatic shock. Cells were separated into single suspension by sequentially passing the suspension through syringes fitted with 16, 18, 21 gauge needles. After centrifugation for 15 min at 800 g, the pellet was resuspended in Iscove modified Dulbecco's medium (IMDM, GIBCO) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS, Gibco) and 10⁻⁸ M dexamethasone (Sigma). Cells were then plated into 75 cm² cell

culture flasks (Nunc) and incubated in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C. Three days later, the medium was partly removed, replaced twice with the complete medium supplemented with 10⁻⁸ M dexamethasone, and then every 3 days with IMDM containing 10% FCS (v/v). Sub-culturing was performed using 0.2% (w/v) trypsin, 5 mM EDTA.

2.2.1.4. Cell attachment. Cell attachment was measured by a modified colorimetric method according to Landegren [21] with some modifications. Briefly, sterile disks of functionalized polymer were placed in 24-wells tissue culture plates

(Corning) that had been previously coating with 2% agarose. HOP cells were seeded at a density of 3×10^4 cells per cm^2 on each material and allowed to attach for different times (3, 6 and 24 hours for HOP) at 37 °C in serum-free IMDM medium. Then, non-adherent cells were removed by washings with PBS 0.1 M pH 7.4. Chromogenic substrate solution of 500 μl (7.5 mM substrate (*p*-nitrophenyl *N*-acetyl β -D glucosaminide); 0.1 M Na citrate; pH 5; 5% (v/v) Triton-X 100) was added for 2 h at 37 °C in humidified atmosphere. Reaction was stopped with 5 mM EDTA/50 mM glycine pH 10.4. Resulting chromophore was measured spectrophotometrically at 405 nm. The positive and negative controls of cell adhesion were the tissue culture polystyrene (TCPS) and agarose (2%) coating, respectively.

2.2.2. Elaboration of surfaces with well-defined topochemistry

2.2.2.1. Photolithography.

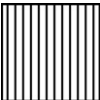
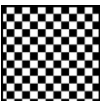
First photoresist resin was spin coated with a Karl Suss spin coater at 1100 rpm during 1930 s. Then resin was warmed at 110 °C during 10 min before irradiation through Cr mask (Femto-St Sciences & Technologies, Besançon, France) by UV lamp (15 s, 220 V, 50 Hz, 60 W). Patterns were revealed during 1940 s in a Microposit Developer (50% in water) before to be drying in an oven (30 min, 120 °C).

List of patterns present on the mask is reported in Table 1.

2.2.2.2. UV excimer laser ablation.

Ablation was performed onto the graft surface by using a pulsed KrF excimer laser (248 nm, 20 ns per pulse) whose beam illuminates a metallic mask consisting of a slot of 750 μm width which is imaged on the graft surface by means of a precision lens (fully aberration corrected, designed by F. Goodall, RAL, UK) of 0.2 numerical aperture, capable of a lateral resolution of $\sim 0.5 \mu\text{m}$ (Fig. 2). The field of irradiation on the sample has a size of $\sim 2 \text{ mm}$. The image of the mask is transferred (without contact) to the sample with a size reduction of 10, at a fluence of $1 \text{ J}/\text{cm}^2$, enough to achieve spontaneous ablation since threshold is of the order of $\sim 35 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. The best image is in the mask conjugated plan position with respect to the lens and is determined

Table 1
Different designs obtained by photolithography

Design (1 cm^2)	Reference	Space between RGD zones (μm)	RGD thickness (μm)
	A	10 μm	10 μm
	B	10 μm	50 μm
	C	10 μm	100 μm
	D	10 μm	300 μm
	E	100 μm	10 μm
	F	100 μm	50 μm
	G	100 μm	100 μm
	H	100 μm	300 μm
	I	300 μm	10 μm
	J	300 μm	100 μm
	K	300 μm	300 μm
	L	10 μm	10 μm
	M	50 μm	50 μm
	N	100 μm	100 μm
	O	300 μm	300 μm
	Random design	P	Random

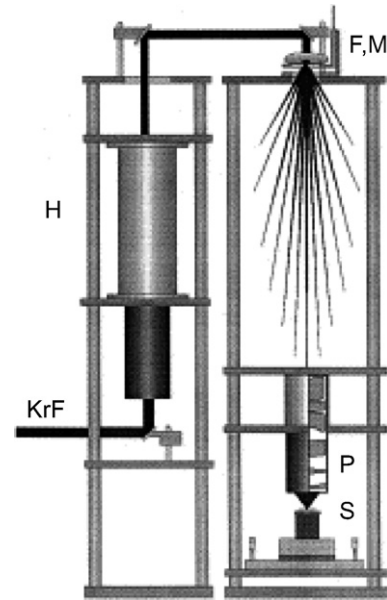


Fig. 2. Schematic of the experimental setup. The image of the mask is projected and etched onto the surface of the sample (S) after the KrF laser beam travels through the homogenizer (H), the field lens (F), the mask (M) and the projection lens (P).

experimentally by a z-scan experiment [22]. The sample was irradiated in a step-and-repeat mode by lateral displacement adjusted to the desired distance (e.g. 5–300 μm), in order to perform the next microgroove (one cycle). The entire operation (10 cycles) was driven manually. A series of microgrooves could thus be obtained, the number of pulses varied between 1 and 10 pulses.

2.2.2.3. Micro-patterns characterizations. Optical microscope.

Optical microscope, provided from Nikon (Japan), was used to validate creation of micro-patterns by photolithography.

High resolution micro-imager.

A micro-imager is based on contact imaging through a solid scintillator sheet (Fig. 3). Light emitted is amplified through an image intensifier tube and is

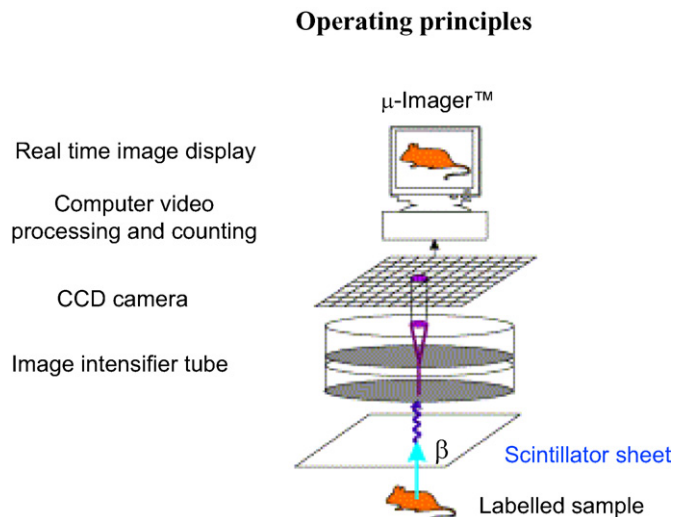


Fig. 3. μ -Imager principle.

analyzed with a CCD camera. The full field of view is smaller than the first one (24×32 mm) but a better spatial resolution is obtained (typically $15 \mu\text{m}$ for ^3H , $20 \mu\text{m}$ for ^{14}C and ^{35}S).

Quantitatively, peptides concentration was evaluated by grafting ^3H -Lysine instead of RGDC peptide. Radiolabeled lysine grafting was performed incubating (step 3 of the chemical procedure (Fig. 1)) PET samples in a solution of ^3H -Lys diluted in Lysine solution (2×10^{-3} M). Radioactivity of this latter solution was adjusted to $6 \mu\text{Ci/ml}$.

To evaluate the stability of grafted Lysine in water, the ^3H activity (in cpm/mm^2) was calibrated at each analysis. Calibration of the entire probed area was first done stating the signal corresponding to the activity of ^{14}C standard slides to a constant level. The ^3H radioactive decay was not finally taken into account since its half-life (14 years) is negligible vs. the experiments duration.

Scanning electron microscopy: SEM. SEM was carried out at 15 kV using a Hitachi S-2500 scanning electron microscope in order to study material topography after laser ablation. Prior to observe samples, these were coated with a sputter coater equipped with a gold target.

Optical profilometer. Veeco optical profilometer (Wyko NT1100) was used in order to characterize laser ablated areas (roughness, ablation depth).

3. Results

3.1. Validation of RGDC grafting

Firstly, the RGD peptide grafting was validated by toluidine blue, XPS, high resolution μ -imager and cell attachment.

3.1.1. Toluidine blue

Toluidine blue was used to evaluate the density of COOH created onto (i) PET surface after hydrolysis and oxidation (Figs. 1,4) (ii) as well as onto PET surface after RGD grafting (Fig. 1).

- (i) Native polymer already contains COOH function because of the end chains. However, we have a significant difference between virgin PET ($[\text{COOH}] = 1.7 \text{ nmol/cm}^2$) and treated PET ($[\text{COOH}] = 15.7 \text{ nmol/cm}^2$) (Fig. 4).

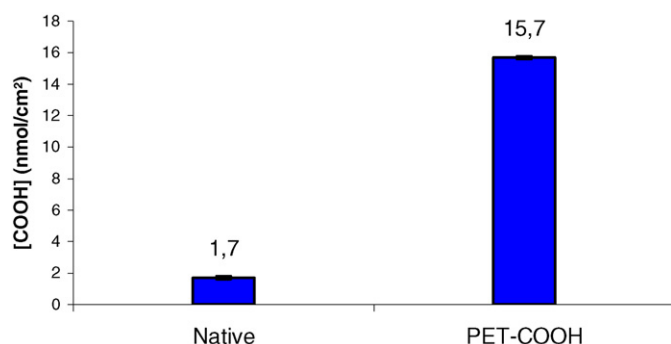


Fig. 4. Evaluation of COOH density onto native PET and PET-COOH surfaces.

- (ii) Moreover we want to evaluate the increase of COOH after RGDC grafting onto PET surface. We know that reaction of NHS molecules onto COOH functions (Fig. 1) is not a 100% reaction, so surface present residual COOH after step 2 (Fig. 1). In order to evaluate COOH density only due to RGDC grafting (Fig. 1, step 3) in this experiment, we consider PET-NHS like reference. As expected, we observe an increase of the amount of COOH function on the surface after RGDC peptide grafting (Fig. 1, step 3) ([increase of $[\text{COOH}] = 6.5 \text{ nmol/cm}^2$] step [Fig. 1]).

3.1.2. X-ray photoelectron microscopy: grafting validation

Table 2 gives the change in the atomic ratios on the top surfaces. The analysis of the proportion of the individual chemical states after deconvolution of C_{1s} , O_{1s} spectra confirm the expected chemical structure (Figs. 5–7). The C_{1s} spectrum principally shows four components present in PET: O-C=O at 288.40 eV, C-O at 286.19 eV, C-CO_2 at 285 eV and C-C at 284.4 eV (Fig. 5).

Table 2

Experimental atomic composition (%) obtained by XPS analysis in the case of virgin PET surface and PET grafted with COOH, NHS and RGDC

Material	C	O	N
PET-COOH	66.4	32.9	–
PET-NHS	67.9	30.1	2
PET-RGDC	66.5	30.2	2.6

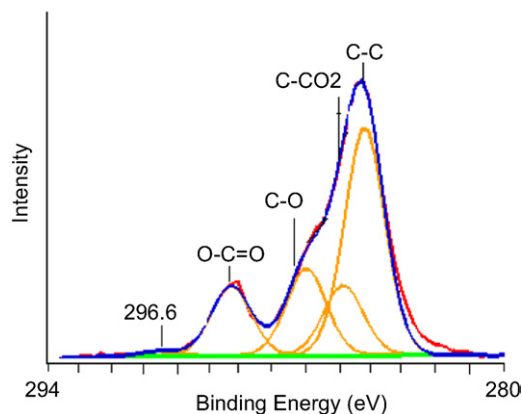


Fig. 5. XPS spectrum of native PET.

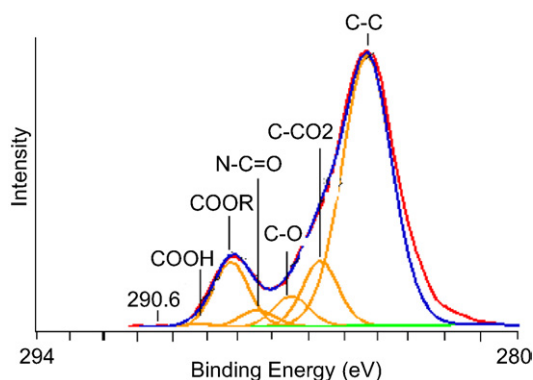


Fig. 6. XPS spectrum of PET-NHS.

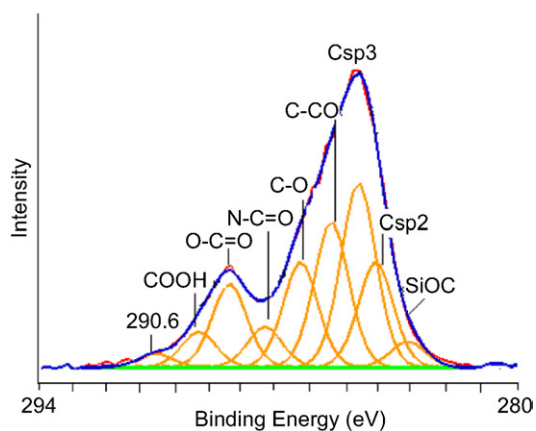


Fig. 7. XPS spectrum of PET-RGDC.

As expected (Table 2), N appears after NHS grafting (Fig. 1). One new component appears at this step (Fig. 7): at 287.6 eV which is characteristic of $O=C-N$ component. Moreover, we can see a decrease of COOH bonds that proved we modified covalently PET surface by NHS grafting instead of carboxylic functions (Figs. 5,6). Indeed, there is a proportional decrease of $C-C=O$ and an increase of $N-C=O$.

After peptide grafting (Fig. 1), XPS analysis confirm the increase of the nitrogen content (Table 2). No great modifications were observed for C_{1S} spectrum after RGDC grafting (Fig. 7).

Thus, based upon XPS results, it seems reasonable to say that RGDC peptide grafting effectively takes place following the theoretical scheme but without systematic hanging of the various molecules between them (Fig. 1).

3.1.3. High resolution μ -imager

Peptides concentration was estimated by grafting 3H -Lys instead of RGDC (Fig. 1) and hence measuring activity A (in cpm/mm^2) of the as-treated materials by high resolution μ -imager. The as-measured activity was then calibrated stating the signal corresponding to the activity of ^{14}C standard slides to a constant level. RGD grafted density was evaluate at $1.7 pmol/mm^2$.

3.1.4. Cell attachment

Cell attachment tests were carried out on homogeneous surfaces grafted with RGD peptides. The potential of these RGDC peptides to promote the cells adhesion to PET was investigated using osteoprogenitor cells (Fig. 8).

These quantitative results reveal that RGDC peptides constitute a good ligand to increase the cell adhesion at short times (1–24 h). Indeed, cells bond to PET modified by RGDC peptides are more numerous than one that corresponding to virgin PET whatever the seeding hours (1, 3 and 24 h).

3.2. Micro-patterns characterization

3.2.1. Photolithography

Micro-patterns obtained by photolithography were characterized by optical microscope and high resolution μ -imager.

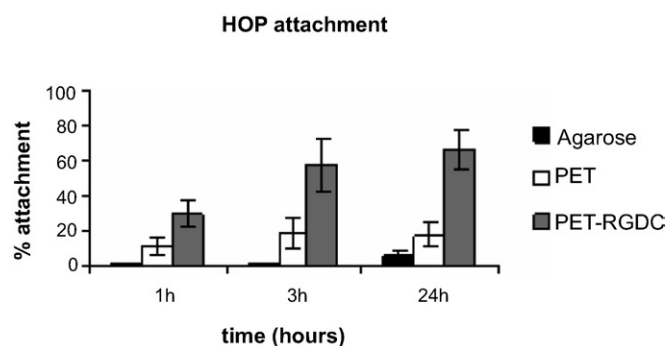


Fig. 8. HOP attachment on PET and RGDC grafted PET ($[RGDC] = 1.7 pmol/mm^2$).

3.2.1.1. *Optical microscopy*. Optical microscope was used to control photoresist patterns created by first placing mask containing a lithographically defined domains in contact with the photoresist film and exposed to UV light (Fig. 9). Geometry obtained on material are close from mask designs; this result induces that parameter are well controlled (time of UV exposition, time of revelation).

3.2.1.2. *High resolution μ -imager*. In order to ensure that resin is totally removed, we grafted 3H -lysine on the patterns. We used high resolution μ -imager in order to validate this grafting. Pictures obtained from optical microscope and μ -imager were compared and we verified the lysine is grafting in micro-patterns (Fig. 10).

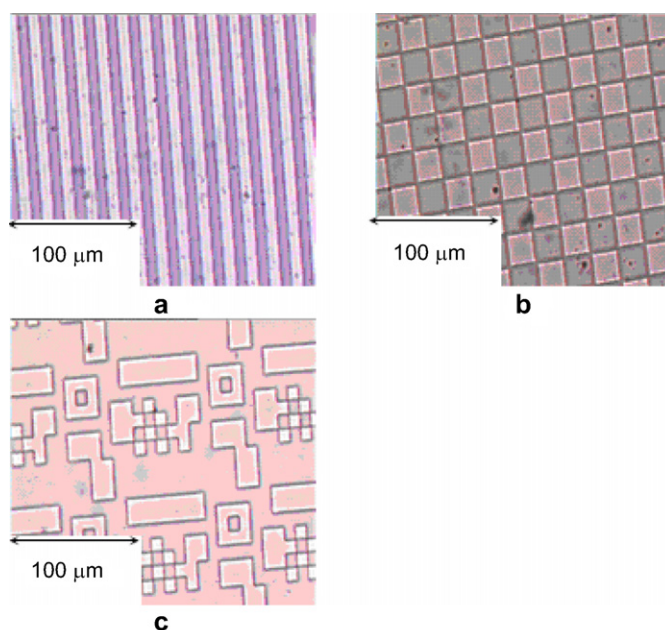


Fig. 9. Optical microscope pictures of photoresist patterns created by first placing a mask containing lithographically defined domains in contact with the photoresist film and exposed to UV light. Design A ($10 \times 10 \mu m$), (b) design M ($50 \times 50 \mu m$), (c) random design (Table 1).

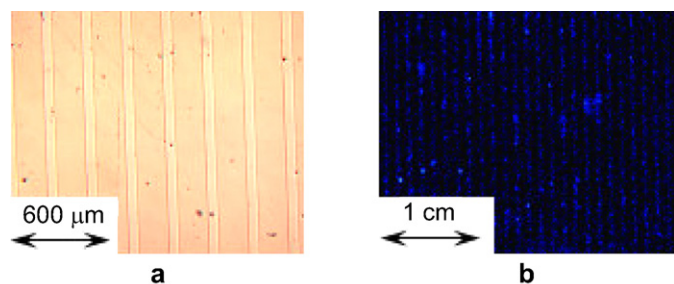


Fig. 10. Optical microscope pictures of (a) photoresist patterns created by first placing a mask containing lithographically defined domains in contact with the photoresist film and exposed to UV light: design J (Table 1); (b) PET surfaces patterns, now free of photoresist grafted with ^3H -lysine. Using micro-imager, we show the localization of ^3H -lysine onto the defined patterns.

3.2.2. UV excimer laser ablation

Micro-patterns obtained by UV excimer laser ablation were characterized by SEM, optical profilometer and high resolution μ -imager.

3.2.2.1. SEM. The best image is in the mask conjugated plan position with respect to the lens and is determined experimentally by a z-scan experiment. SEM was used to evaluate the best image obtained (Figs. 2,11). If z position is not perfectly adjusted, images obtained can be deformed. This problem can be observed on Fig. 11a, c:

- Fig. 11a: $z = 0.80$ mm, after irradiation image is not transferred on sample;
- Fig. 11c: $z = 0.9$ mm, image is transferred but we can observe some parasitic phenomenon (lines on the edge of the squares).

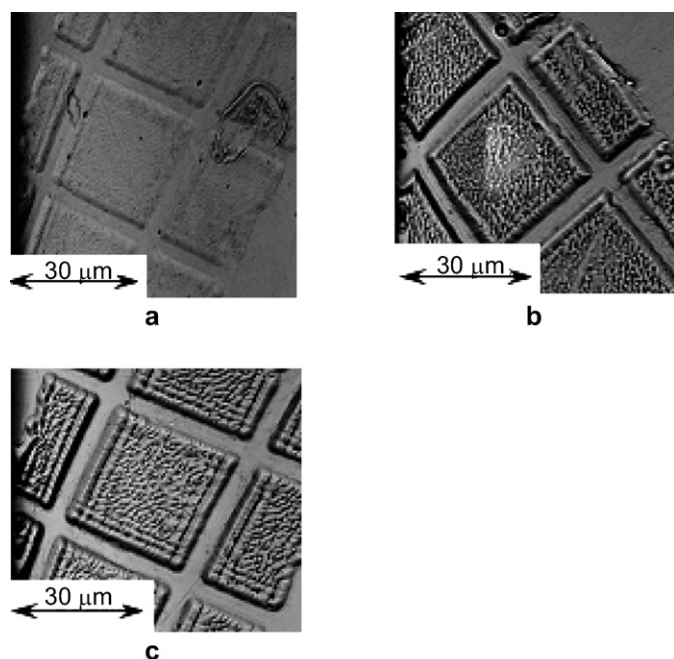


Fig. 11. Pictures obtained by SEM for different z positions: (a) $z = 0.8$ mm, 1 pulse; (b) $z = 0.85$ mm, 1 pulse; (c) $z = 0.9$ mm, 1 pulse.

After these observations we chose to work with a $z = 0.85$ mm (Fig. 11b) that seems to give the best image.

Number of pulses is also very important because it controls ablation depth. In our study this ablation depth is an important parameter:

- Since the whole RGD peptide layer must be removed.
- In other hand, if ablation depth is too important, cell attachment can be altered by topographical effects [23,24].

Number of pulses varied between 1 and 20 pulses and resulting materials were analyzed by SEM (Fig. 12). We chose to test three different pulses number: 1 p (Fig. 12a), 10 p (Fig. 12b) and 20 p (Fig. 12c).

- After 1 pulse (Fig. 12a): image resolution is sharp and ablation depth was measured < 0.5 μm (Fig. 15). This depth could seem sufficient comparatively with the steric hindrance of RGDC peptide (evaluated by Hyperchem software at 1.2 nm). Since peptide penetration in polymer network is unknown we have generated more important ablation depth to ensure total peptide layer removing.
- After 10 pulses (Fig. 12b): image is still well defined.
- After 20 pulse (Fig. 12c): we can observe a saturation that perturbs image resolution.

Consequently, we decided to work with 10 pulses which seems to satisfy all above mentioned parameters.

3.2.2.2. Optical profilometer. In addition to SEM observations, each sample was analyzed with optical profilometer (Fig. 7) in order to control ablation depth (Figs. 13,14) [22].

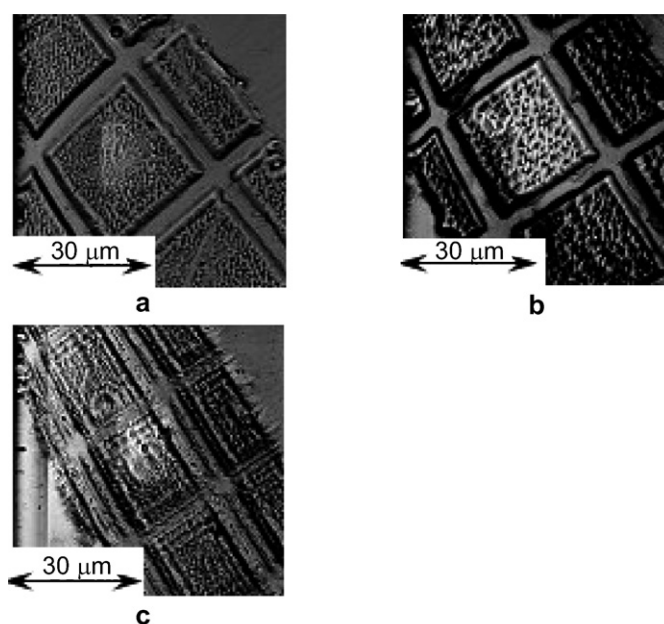


Fig. 12. Pictures obtained by SEM for different number of pulses; $z = 0.85$ mm; (a) $P = 1$ pulses; (b) $P = 10$ pulses; (c) $P = 20$ pulses.

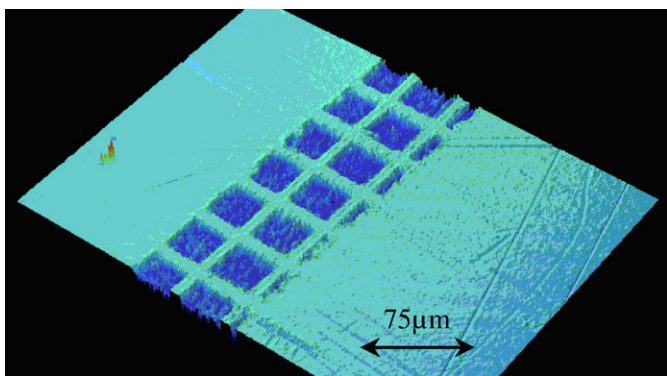


Fig. 13. 3D picture (obtained by optical profilometer) of RGDC-PET ablated with 10 laser pulses.

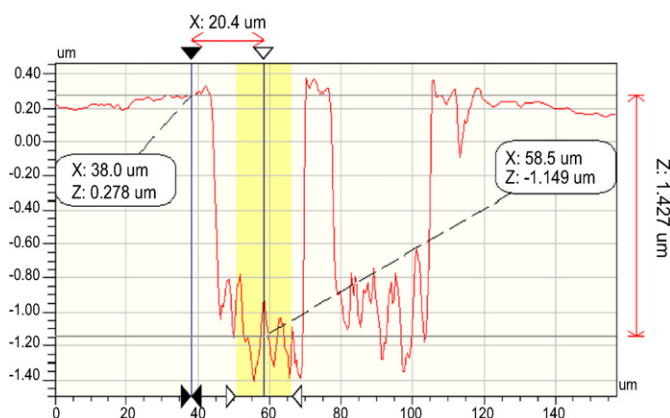


Fig. 14. Depth analysis of RGDC-PET (obtained by optical profilometer).

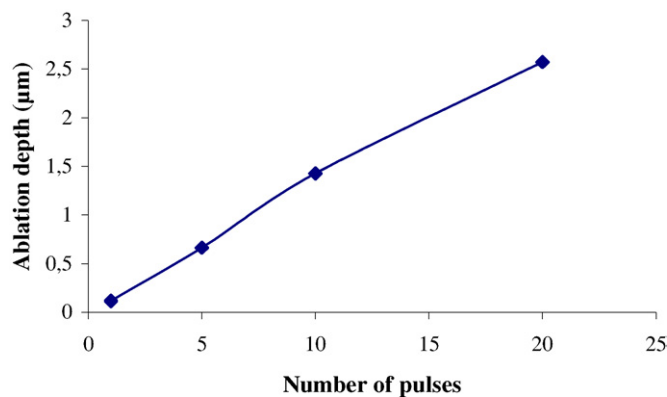


Fig. 15. Ablation depth variation with number of pulses (obtained by optical profilometer).

Experiment was realized between 1 and 20 pulses with a $z = 0.85$ mm. Until this limit we can observe a proportional increase of ablation depth with the number of pulses. This curve (Fig. 15) permits us to modulate depth ablation according to pulses number.

3.2.2.3. High resolution μ -imager. ^3H -lysine was grafted instead of RGDC peptide onto PET (Fig. 1) in order to have homogenous surface. Then, we used UV excimer laser to remove ^3H -lysine from the surface with well-defined design. High resolution μ -imager picture (Fig. 16) shows black stripes

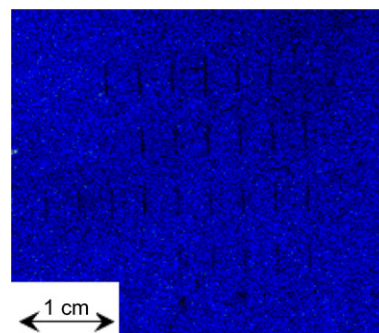


Fig. 16. Picture of RGDC-PET ablated by laser excimer obtained by high resolution micro-imager; black lines provided from ablation of ^3H -lysine grafted instead of RGDC.

(without radioactivity) and blue areas (presence of radioactivity). This result proves that labeled amino acid was removed within laser generated pattern.

4. Discussion

4.1. RGDC peptide grafting onto PET

RGD-containing peptides have been used to improve the qualities of the cell culture supports, either by coating, or by covalent grafting since 1984 [14]. Number of studies has proved that immobilization of adhesive peptides on materials enhances endothelial [1,15,25–30] and osteoblast [1–3,31,32] cells adhesion. Much effort has been devoted to ensure stability of the peptide bonding and accessibility to active sites through physical adsorption and chemical binding. Physical adsorption may not be successful in promoting long-term implantation because of the risk of desorption and/or exchange [33] or difficulties in controlling the presentation of the active sequence towards target cells. Massia and Hubbell [29], for example, have demonstrated that polymeric surfaces with grafted RGD-peptides were found to exhibit biological activity. In this study we chose to graft covalently RGDC peptides onto PET in order to promote cell adhesion. Peptide densities and distribution onto polymer surface were determined by using μ -Imager. The amount of RGDC peptides grafted onto PET surface was evaluated to $[\text{RGDC}] = 1.7 \text{ pmol/mm}^2$ what seems to be sufficient to enhance cell adhesion [26,27,34].

4.2. Elaboration of surfaces with well-defined topochemistry

When hybrid biomaterials are produced, the current consensus, agreed by many research teams over the world, is to distribute the bioactive ligands in a controlled fashion in the form of nanoscale (clusters or nanodomains) and no long in a homogeneous or statistically based way. Maheshwari et al. [16] demonstrate that cell motility may be regulated by varying ligand spatial presentation at the nanoscale level, and suggest that integrin clustering is required to support cell locomotion. As a result, the current objective now for a number of researchers [13,35–39] is to be able to produce nanostructured surfaces which will display variable densities and distributions of mole-

cules, like peptides on the surface. In this study we wanted to create RGDC micro-patterns onto PET in order to study spatial peptide distribution impact on cell attachment.

The ability to generate small structures is central to modern science and technology. There are many opportunities that might be realized by making new types of small structures, or by downsizing existing structures. There exists nowadays several methodologies that permit to generate nano-patterns on materials: Dip Pen lithography [39] or scanning probe lithography [36], micro-contact printing [7,8], microfluidic patterning [9,10] or micromolding [11]. At present these techniques are only used with self assembled monolayer (SAM). Indeed, the grafting of molecules on a nanometric scale asks for the development of new strategies of surface modification. For example, the fast evaporation of some picoliters of solution is a parameter to be taken into account (compared to time necessary to grafting).

In order to simplify elaboration of patterns we chose to work at micrometer scale and we focused our study on two different methodologies which allow grafting of biomolecules on the surface of materials: photolithography and UV excimer laser ablation.

These two methodologies are different: with the laser, we graft RGDC onto PET and we remove peptide in well chosen sites; with photolithography we create patterns and after we graft peptide. Each technique presents advantages and disadvantages which be developed in next paragraphs.

4.2.1. Photolithography

Photolithography is a technique that creates a pattern by irradiating a resist material and subsequently transferring the pattern by either substrate etching or material deposition. Photolithography, with its rapid and reliable parallel processing for the structuring of materials, has become the standard in chip manufacturing and is still used for the production of most integrated circuits in electronic devices.

This technique has two main advantages: a low cost and a large range of designs. However the size of patterns is limited by shadow phenomena at 10 μm [40] and we have to use organic solvent to remove residual photoresist.

The observation by optical microscopy of the patterns created on the PET surface coupled with the pictures obtained by micro-imager make it possible to confirm the total removal of the resin after UV exposition and then the grafting of ^3H -lysine in the selected areas. We can see using μ -imager that ^3H -lysine is present on polymer surface and the spatial distribution of the molecule on the surface can be correlated with design observed by optical microscope (Fig. 10).

4.2.2. UV excimer laser ablation

Laser ablation is the second way used to obtain micro-patterned surfaces. This technique has two main advantages: we do not need to use organic solvent and the patterns size can decrease until micrometer scale. But this method presents some disadvantages: we do not ablate only RGDC peptide but also polymer film that induce some modifications.

The study of the physical and chemical consequences of the laser treatment of PET has been studied for few years [41,42]. Former studies shown that laser ablation induce physico-chemical and chemical alterations and can enhance MC3T3 adhesion [42]. Indeed, laser ablation is able to change the surface properties of the material and modify platelet adhesion and cell behavior [43,44]. It is subsequently appears predictable that the physico-chemical modifications will influence the interactions between the cells and the substrate. Ramires et al. [45] shown, by XPS analysis, consequences of laser treatment: C_{1s} spectra prove emergence of a new chemical component (hydroxyl, C–OH) on the PET surface. This various kind of oxidized groups, caused by decomposition of peroxides by laser pulses, are formed in large amounts on the PET surface [43] and are known to enhance cell adhesion [46,47].

In our case, protocol was updated in order to well control surface modifications during ablation of RGDC peptides onto PET surface:

- The first step was to evaluate the right position between lens and sample in order to have the best resolution (Fig. 11).
- The second step consists in the evaluation of the number of pulses during ablation. To choose this parameter two elements have to be taken in consideration:
 - all peptides have to be removed from the surface to create micro-patterns;
 - ablation modifies more or less topography (ablation depth, roughness) and it is currently well-known that the cellular adhesion is influenced by the topography of materials surface [23,48].

SEM and optical profilometer permitted us to adjust ablation parameters: $z = 0.85\text{mm}$ and $n = 10$ pulses. Laser excimer modifications induce micro-patterns but also polymer modifications which have to be studied by in vitro experiments.

5. Conclusion

A three-step reaction procedure was developed to attach RGD-containing peptides onto PET surface with controlled density in order to clarify the capacity of RGD peptides to interact with integrin receptors to promote osteoblasts adhesion at 1, 3 and 24 h. First, cleaned polymer surfaces were hydrolyzed then oxidated with KMnO_4 in acid conditions, resulting in COOH functionalization. Secondly, the free carboxylic groups were linked to the hetero-cross-linker: dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide hydrochloride and *N*-hydroxysuccinimide. Finally, cell-adhesive peptides (linear RGDC) were immobilized onto the resulting surface by means of covalent amide bondings. The surface modifications, the presence of different chemical elements and the covalent immobilization of RGD-sequence peptides onto the surface of PET were confirmed by the XPS analysis. Peptide density was evaluated by high resolution μ -imager at $[\text{RGDC}] = 1.7 \text{ pmol/mm}^2$ that is seemed sufficient to improve osteoblastic cells adhesion.

Micro-patterns were created onto polymer surface using two different ways: photolithography and UV excimer ablation laser. These patterns were characterized by optical microscopy, SEM, optical profilometry and high resolution μ -imager.

This study will be completed by focal contact observation using a confocal microscope. Moreover, an immunogold labeling method will be developed to visualize focal adhesions using back-scattered electron imaging with a scanning electron microscope (SEM). In addition, our current research is interested in the evaluation of the cellular attachment on RGDC-PET ablated surface and patterns created by photolithography in order to better understand the influence of the micro-patterns on the cellular attachment.

References

- [1] Durrieu M-C. Conception, elaboration et caracterisation de materiaux bioactifs. ITBM-RBM 2005;26(3):229–37.
- [2] Pallu S, Bourget C, Bareille R, Labrugere C, Dard M, Sewing A, et al. The effect of cyclo-DfKRG peptide immobilization on titanium on the adhesion and differentiation of human osteoprogenitor cells. Biomaterials 2005;26(34):6932–40.
- [3] Porte-Durrieu MC, Guillemot F, Pallu S, Labrugere C, Brouillaud B, Bareille R, et al. Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti–6Al–4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. Biomaterials 2004;25(19):4837–46.
- [4] Hasenbein ME, Andersen TT, Bizios R. Micropatterned surfaces modified with select peptides promote exclusive interactions with osteoblasts. Biomaterials 2002;23(19):3937–42.
- [5] Hahn MS, Taite LJ, Moon JJ, Rowland MC, Ruffino KA, West JL. Photolithographic patterning of polyethylene glycol hydrogels. Biomaterials 2006;27(12):2519–24.
- [6] Farland CDM, Thomas CH, Defilippis C, Steele JG, Healy KE. Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces. J Biomed Mater Res 2000;49(2):200–10.
- [7] Bo Wang JFCG. Printing biomacromolecules on a bovine serum albumin precursor layer. Macromol Biosci 2005;5(8):767–74.
- [8] Huang TT, Genq T, Akin D, Chang WJ, Sturgis J, Bashir R, Bhunia AK, Robinson JP, Ladisch MR. Micro-assembly of functionalized particulate monolayer on C18 derivatized SiO surfaces. Biotechnology and Bioengineering 2003;83(4):416–27.
- [9] Kim Y-D, Park CB, Clark DS. Stable sol–gel microstructured and microfluidic networks for protein patterning. Biotechnol Bioeng 2001;73(5):331–7.
- [10] Miller JS, Béthencourt MI, Hahn M, Lee TR, West JL. Laser-scanning lithography (LSL) for the soft lithographic patterning of cell-adhesive self-assembled monolayers. Biotechnol Bioeng 2006;93(6):1060–8.
- [11] Khademhosseini A, Eng G, Yeh J, Fukuda J, Blumling 3rd J, Langer R, et al. Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2006;79(3):522–32 (A).
- [12] Greene ME. Application of scanning probe microscopy to the characterization and fabrication of hybrid nanomaterials. Microsc Res Tech 2004; 64(5–6):415–34.
- [13] Daan Wouters USS. Nanolithography and nanochemistry: probe-related patterning techniques and chemical modification for nanometer-sized devices. Angew Chem Int Ed 2004;43(19):2480–95.
- [14] Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 1984;309(5963):30–3.
- [15] Massia SP, Hubbell JA. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. J Biomed Mater Res 1991;25(2):223–42.
- [16] Maheshwari GBG, Lauffenburger DA, Wells A, Griffith LG. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. J Cell Sci 2000; 113:1677–86.
- [17] Chollet C, Chanseau C, Brouillaud B, Durrieu MC. RGD peptide grafting onto poly (ethylene terephthalate) with well controlled densities. Biomol Eng 2006 (in press).
- [18] Chollet C, Remy-Zolghadri M, Guillemot F, Labrugère C, Granja PL, Durrieu MC. RGD peptide grafting onto poly (ethylene terephthalate): physico-chemical and biological characterisation. Biomaterials 2006 (submitted).
- [19] Emiko Uchida YU, Ikada Y. Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film. Langmuir 1993;9(4): 1121–4.
- [20] Vilamitjana-Amédée J, Bareille R, Rouais F, Caplan AI, Harmand MF. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. In vitro Cell Dev Biol 1993;29:699–707.
- [21] Landegren U. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. J Immunol Methods 1984;67(2):379–88.
- [22] Chollet C, Lazare S, Brouillaud B, Labrugere C, Bareille R, Durrieu MC. RGD peptide grafting onto micro-patterned pet: peptide distribution impact on cell attachment. Journal of Laser micro/nano engineering 2006;1(3):226–30.
- [23] Anselme K, Biggerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. Acta Biomaterialia 2005;1(2): 211–22.
- [24] Duncan AC, Rouais F, Lazare S, Bordenave L, Baquey C. Effect of laser modified surface microtopochemistry on endothelial cell growth. Colloids Surf B Biointerfaces 2007;54(2):150–9.
- [25] Baquey C, Palumbo F, Porte-Durrieu MC, Legeay G, Tressaud A, d’Agostino R. Plasma treatment of expanded PTFE offers a way to a bio-functionalization of its surface. Nucl Instrum Methods Phys Res B 1999; 151(1–4):255–62.
- [26] Hubbell JA, Massia SP, Drumheller PD. Surface-grafted cell-binding peptides in tissue engineering of the vascular graft. Ann N Y Acad Sci 1992;665:253–8.
- [27] Massia SP, Stephen P, Hubbell JA. Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. Anal Biochem 1990;187(2):292–301.
- [28] Hubbell JA, Massia SP, Desai NP, Drumheller PD. Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. Biotechnology (N Y) 1991;9(6):568–72.
- [29] Massia SP, Hubbell JA. Covalently attached GRGD on polymer surfaces promotes biospecific adhesion of mammalian cells. Ann N Y Acad Sci 1990;589:261–70.
- [30] Porté-Durrieu MC, Labrugère C, Villars F, Lefebvre F, Dutoya S, Guette A, et al. Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces: XPS characterization and human endothelial cell interactions. J Biomed Mater Res 1999;46(3):368–75.
- [31] Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, Bareille R, Amédée J. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. J Mater Sci Mater Med 2004;15:779–86.
- [32] Bartouilh de Taillac L, Porte-Durrieu MC, Labrugere C, Bareille R, Amédée J, Baquey C. Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation. Composites Science and Technology 2004;64(6):827–37.
- [33] Castner DG, Ratner BD. Biomedical surface science: foundations to frontiers. Surf Sci 2002;500(1–3):28–60.
- [34] Massia SP, Hubbell JA. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. J Cell Biol 1991;114:1089–100.
- [35] Curtis A, Wilkinson C. Nanotechniques and approaches in biotechnology. Trends Biotechnol 2001;19(3):97–101.
- [36] Sung I-H, Kim D-E. Nano-scale patterning by mechano-chemical scanning probe lithography. Appl Surf Sci 2005;239(2):209–21.
- [37] Ramanujam PS. Optical fabrication of nano-structured biopolymer surfaces. Opt Mater 2005;27(6):1175–7.
- [38] Falconnet D, Csucs G, Michelle Grandin H, Textor M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. Biomaterials 2006;27(16):3044–63.

- [39] Ginger DS, Zhang H, Mirkin CA. The evolution of Dip-Pen nanolithography. *Angewandte Chemie International Edition* 2004;43(1):30–45.
- [40] Menon R, Patel A, Gil D, Smith HI. Maskless lithography. *Mater Today* 2005;8(2):26–33.
- [41] Duncan AC, Lazare S, Baquey C. Use of biological nanoprobe for the characterization of micropatterned surfaces obtained by ultraviolet laser lithography. *Appl Surf Sci* 2004;221(1-4):93–8.
- [42] Mayer G, Blanchemain N, Dupas-Bruzek C, Miri V, Traisnel M, Gengembre L, et al. Physico-chemical and biological evaluation of excimer laser irradiated polyethylene terephthalate (pet) surfaces. *Biomaterials* 2006;27(4):553–66.
- [43] Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N, Daliri M. Cell behavior on laser surface-modified polyethylene terephthalate in vitro. *J Biomed Mater Res* 2001;57(2):183–9.
- [44] Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N, Salehian P. In vitro studies of platelet adhesion on laser-treated polyethylene terephthalate surface. *J Biomed Mater Res* 2001;54(4):540–6.
- [45] Ramires PA, Mirengi L, Romano AR, Palumbo F, Nicolardi G. Plasma-treated PET surfaces improve the biocompatibility of human endothelial cells. *Journal of biomedical materials research* 2000;51(3):535–9.
- [46] Faucheux N, Tzoneva R, Nagel M-D, Groth T. The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry. *Biomaterials* 2006;27(2):234–45.
- [47] Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJAJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* 2004;25(28):5947–54.
- [48] Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials* 1997;18(24):1573–83.

Quatrième article

RGD peptides grafted onto micro-patterned Poly(ethylene terephthalate): influence of peptide distribution on osteoblast cells attachment

C. Chollet, F. Guillemot, S. Lazare, C. Labrugère, M.C. Durrieu
Biomaterials, soumis à la publication

RGD peptides grafted onto micro-patterned Poly(ethylene terephthalate) : influence of peptide distribution on osteoblast cells attachment

C. Chollet¹, F. Guillemot¹, S. Lazare², C. Labrugère³, M.C. Durrieu¹

¹ INSERM, U577, Bordeaux, F-33076 France ; Univ. Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, F-33076 France
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

²Institut des Sciences Moléculaires (ISM), UMR 5255 du CNRS, Université de Bordeaux 1, 351
cours de la Libération, F-33405 Talence, France

³Centre de caractérisation des Matériaux Avancés, ICMCB-CNRS; Université de Bordeaux 1,
Avenue du docteur Schweitzer, 33608 Pessac, France

ABSTRACT

In order to avoid the problems related to biomaterial use, a new route consist in associating material and autologous cells before implantation, that requires a perfect cooperation between the surface and the cell. To improve cell adhesion on biomaterials, a suitable approach is to functionalize their surface by pro-adhesive ligand grafting. The aim of this study was to covalently graft RGD-containing peptides onto poly(ethylene terephthalate) surface in well-defined microstructures in order to control MC3T3 cells adhesion. We purposed two different methods to obtain micro-patterned materials: the first relies on a photoablation technique using an excimer laser and the second relies on photolithography process. These patterns were characterized by optical microscopy, scanning electron microscopy, optical profilometry and high resolution μ -imager. The biological evaluation of micro-patterned surfaces was done by using optical microscopy, scanning electron microscopy and fluorescence microscopy to study MC3T3 cells morphology, 15 after seeding in serum free conditions. Cells seeded onto photolithographical or photoablated micro-patterned PET exhibit an alignment on RGD areas and appear to be connecting by extending pseudopods towards each other. Whatever the technique used to create micro-patterns, a cell alignment occurs for RGD thickness around 100 μ m. These results prove importance of microstructured surfaces for elaboration of tissue-engineered biomaterials.

1) INTRODUCTION

Many polymeric materials like PET and PTFE are currently used for medical applications like prostheses. Most of these common materials have sufficient mechanical stability and elasticity and are non-toxics. However, these materials present, in long term applications, a random success due to the lack of biointegration in surrounding tissues. For example, the use of poly(ethylene terephthalate) (Dacron®) in vascular surgery present a patency rate of 93% as aortic bifurcation grafts, but its success declines drastically for small diameter vessels. Moreover, PET is not totally an inert material and can be susceptible to chemical attack and hydrolysis that may cause alterations in mechanical properties. However, these properties can be improved by the means of surface modification [1-6]. Thus, last few years, researchers focused their studies on biomaterials surfaces modifications to improve their biocompatibility [1, 2]. A new route is to associate cell population to these biomaterials before implantation in order to obtain perfect biocompatibility. But this “hybrid material” concept requires the surface becomes more “attractive” for cells that will colonise it. To do this, one suitable approach is to functionalize the surface of the materials by “pro-adhesive” ligands likely improve cell adhesion and hence the cell and tissue colonisation of these materials. The cell responses are then controlled by intra-cellular signaling pathways that are originally triggered by transmembrane proteins interacting with the engineered surface [7]. Since 1984, RGD

peptide is known to enhance cell attachment on biomaterials surfaces. This attachment property is due to the presence of integrin receptors implied in cellular adhesion phenomena [8]. Today, number of studies has proved that immobilization of adhesive peptides on materials enhances endothelial [9-16] and osteoblast [16-20] cells adhesion. However, the surface chemistry of such engineered materials, characterized by the type of cell-binding ligands (peptides, proteins, etc.), their surface density [21, 22] and spatial distribution [23] as well as their conformation, have been demonstrated to be an important surface cues. For example, Massia and Hubbell [10] focused their studies on the evaluation of minimal RGD density necessary to enhance cell adhesion. They have shown that at very low RGD peptides densities, fibroblasts attach but do not spread while at higher densities (1 fmol/cm²), i.e. when the spacing between peptides reaches 440 nm, they do. Furthermore, when the RGD density reaches 10 fmol/cm² (corresponding to a spacing of at least 140 nm), focal contact formation (small region on the surface of the fibroblast that is anchored to the substrate) and normal stress fiber organization were demonstrated. Thereafter, other teams tried to correlate RGD density with cell adhesion [24-26]. More recently, Maheshwari and al. demonstrate that cell motility may be regulated by varying ligand spatial presentation at the nanoscale level, and suggest that integrin clustering is required to support cell locomotion [23].

Another promising approach to improve implant biointegration is the realisation of micropatterns on the biomaterial surfaces. Indeed, the presence of microstructures on a surface allows the control of cell-substrate interactions by creating, in some cases, patterns of cells that are highly oriented and differentiated [27]. For this reason, microfabrication techniques have been widely used to produce surface topographies to investigate the processes of cell adhesion, spreading, migration, proliferation, and gene expression, as they allow precise production of specified topographies [28, 29].

Thanks to the results obtained by these two different approaches, microfabrication techniques combined with surface chemistry and material science knowledge has provided new tools to explore, *in vitro*, the interactions of cells with their environment. Indeed, the ability to spatially control the chemistry, the pattern geometry and the local substrate stiffness provides new perspectives into the fundamental aspects of cell–surface interactions.

In this article we purpose to graft RGD-containing peptides onto poly(ethylene terephthalate) surface in well-defined microstructures in order to control MC3T3 cells adhesion. Thus, we purpose the use of two different ways to obtain micro-patterned materials:

- (i) the first one relies on a photoablation technique combining excimer laser with a non contact microphotolithographical projection technique in order to microfabricate well defined surfaces.
- (ii) second one is photolithography process which is typically the transfer of a pattern to a photosensitive material (a photoresist) by selective exposure to a radiation source. Photoresist may also be used as a template for patterning material deposited after lithography. The resist is subsequently etched away, and the material deposited on the resist is "lifted off".

The aim of this paper is first of all to validate the feasibility of development of well defined and reproducible microdomains then to evaluate the influence of this peptide distribution on the cellular behavior using the MC3T3 osteoblast cell model.

Basically, our study is divided into several parts:

- PET functionalization and characterization with RGD peptides [24],
- Development of micro-patterns onto PET surface using photolithography and UV excimer laser ablation processes [24, 30], and their characterization
- Study of cell behavior onto micro-patterned surfaces
 - Immunofluorescent staining
 - Scanning electron Microscopy observations.

2) MATERIALS AND METHODS

a) Materials

PET material used is a commercial film (Mylar® D) obtained from Dupont Teijin, France. It is in the form of bi-oriented film with a thickness of 75 µm. Inorganic reagents (NaOH, KMnO₄, H₂SO₄, HCl) were obtained by Sigma, France.

Acetonitrile, Dimethylaminopropyl-3-EthylCarbodiimide hydrochloride (EDC), N-HydroxySuccinimide (NHS) and (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES buffer) were obtained from Aldrich, France. RGDC peptides were obtained from Bachem, France. [³H]-L-Lysine solution with 150mCi/mmol was purchased from Amersham, France. S1818 Positive tone photoresist and Microposit Developer were obtained from Shipley, France. Antibodies provided from Molecular Probes and DAPI (4,6-Diamidina-2-phenylin) from Sigma, France.

b) Methods

i) RGD peptide grafting onto Poly(ethylene terephthalate)

(1) Surface preparation of PET and RGDC grafting

PET film (Figure 1) was subjected to ethanol washing and sonicating for purification before use. The three subsequent modifications steps are presented in Figure 2 and are detailed elsewhere [31, 32]:

1. First, materials were modified in order to create COOH functions onto PET surface
 - PET is hydrolysed with 0.25 g NaOH, 25 ml H₂O, 25 ml acetonitrile during 15 h at 60°C
 - PET is oxidized by KMnO₄ in H₂SO₄ (1.2 N) during 1 h at 60°C. After reaction, PET is rinsed one time with HCl (6 N, 10 min) and two times in MilliQ water (2*10 min), then samples dried on Whatman paper.
2. PET-COOH (whatever the treatment) were immersed in a solution of Dimethylaminopropyl-3-EthylCarbodiimide hydrochloride (EDC, 0.2 M) + N-HydroxySuccinimide (NHS, 0.1 M) in (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES buffer, 0.1 M in MilliQ Water). Material obtained is named: PET-NHS.
3. The immobilization of cell-binding peptides containing the RGD sequence and Lysine, was realized in a solution of RGDC (or 3H-Lysine/H₂O (C=10⁻³ M) in the case of micro-imager study) for 15 h at room temperature. After grafting, the disks were rinsed every time with MilliQ Water during one week. Material obtained is named: PET- RGDC.

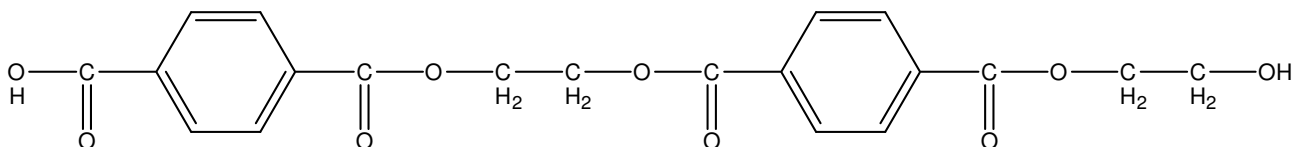


Fig. 1 Native Poly(ethylene terephthalate)

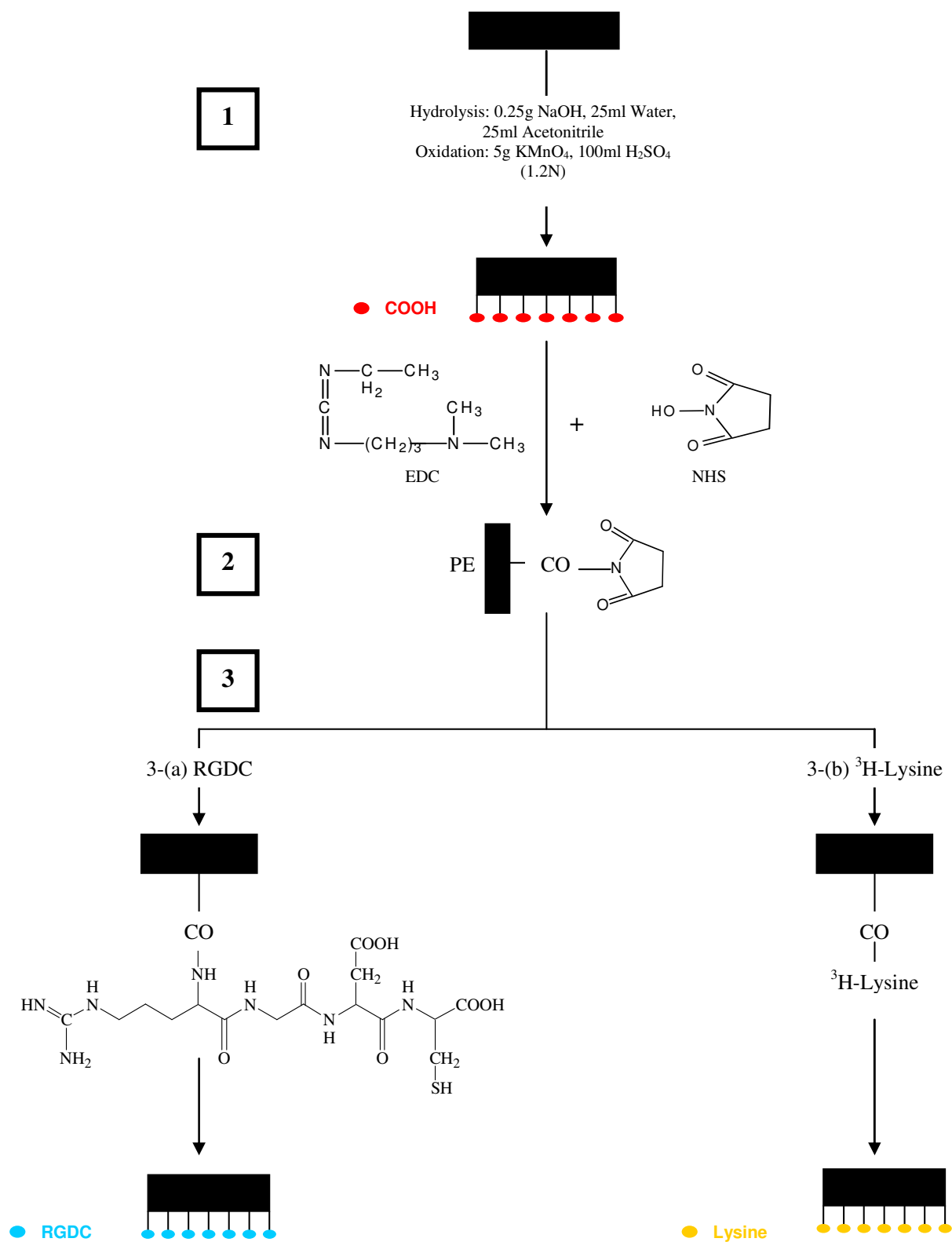


Fig. 2 Sequence of the PET surface modification procedure. (1) PET surface preparation in order to obtain –COOH end chains, (2) reaction with Dimethylaminopropyl)-3-EthylCarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-HydroxySuccinimide (NHS), (3) Immobilization of RGDC or ³H-Lysine containing peptide through amine bonding.

(2) Surface characterisation

(a) *X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)*

A VG Scientific ESCALAB photoelectron spectrometer was used for the surface analysis with a non-monochromatized MgK α 1253.6 eV source of 100 W. The area of the analytical X-ray spot on the sample surface is about 250 microns. A flood gun was used for charge compensation. Acquisition of high-resolution spectra was done at constant pass energy of 20 eV. Fitting was then realized with software provided by VG Scientific, each spectrum being referenced to carbon pollution at 284.8 eV. Binding energies values are given with a precision of ± 0.2 eV.

(b) *Brewster angle microscopy (BAM) measurements*

The RGDC layer grafted onto polymer were evaluated using a Brewster angle microscope (NFT BAM2plus, Göttingen, Germany) mounted on the Langmuir trough. The microscope was equipped with a frequency doubled Nd:Yag laser (532 nm, 50 mW), polarizer, analyser and a CCD camera. The spatial resolution of the BAM was about 2 μm , and the image size 625 \times 400 μm with $\times 10$ lens used.

ii) **Elaboration of surfaces with well-defined topochemistry**

(1) UV excimer laser ablation

Ablation was performed onto the graft surface by using a pulsed KrF excimer laser (248 nm, 20 ns per pulse) whose beam illuminates a metallic mask consisting of a slot of 750 microns width which is imaged on the graft surface by means of a precision lens (fully aberration corrected, designed by F.Goodall, RAL, UK) of 0.2 numerical aperture, capable of a lateral resolution of ~ 0.5 μm (Figure 3) [33]. The field of irradiation on the sample has a size of ~ 2 mm. The image of the mask is transferred (without contact) to the sample with a size reduction of 10, at a fluence adjust in order to achieve spontaneous ablation since threshold is of the order of ~ 35 mJ/cm 2 . The best image is in the mask conjugated plan position with respect to the lens and is determined experimentally by a z-scan experiment [24]. The sample was irradiated in a step-and-repeat mode by lateral displacement adjusted to the desired distance (e.g. 5 to 300 μm), in order to perform the next microgroove (one cycle). The entire operation (10 cycles) was driven manually. A series of microgrooves could thus be obtained, the number of pulses varied between 1 and 10 pulses.

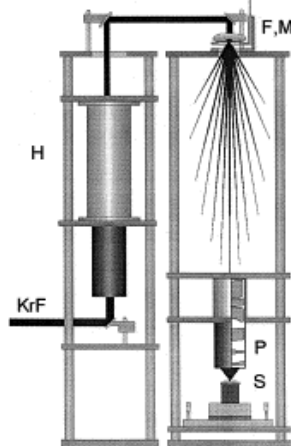


Fig. 3 Schematic of the experimental setup. The image of the mask is projected and etched onto the surface of the sample (S) after the KrF laser beam travels through the homogenizer (H), the field lens (F), the mask (M) and the projection lens (P).

(2) Photolithography

Chemical patterns were formed using photochemical resist materials and conventional photolithographic techniques were employed. The polymer solution was spin coated on PET materials, using a spin coater for 30 s at a rotation speed of 1100 r.p.m. for deposition. This procedure allows the deposition of uniform films approximately 1 μ m thick. The thickness of the layer was checked by profilometry. The films were further dried for 10 min at 110°C. A photoresist pattern was created by first placing a mask containing a lithographically defined metal grid pattern (Femto st sciences & technologies, Besançon, France) in contact with the photoresist film, the latter being exposed to UV light filtering through the mask (15s, 220 Volts, 60 W). The pattern was completed by immersing the substrate in a commercially available developer solution (Microposit Developer (50% in water)), which removed the exposed photoresist and left a photoresist pattern surrounded by bare substrate. PET materials were further dried for 30 min at 120°C. At this step, NHS molecules were covalently bound to the exposed regions of the surface (Step 2, Figure 2). Then, RGDC peptides were covalently grafted onto polymer surface (Step 3, Figure 2). The photoresist pattern was then removed by a 1 min soak in acetone revealing the underlying substrate.

(3) Micro-patterns characterization

(a) *Scanning Electron Microscopy: SEM*

SEM (Hitachi S-2500) was carried out at 15 kV to obtain an overall picture of the surface finishing and topography of the materials after laser ablation. Samples were coated with a sputter coater equipped with an Au target. SEM micrographs were taken at several randomly chosen areas.

(b) *Optical Profilometer*

Veeco optical profilometer (Wyko NT1100) was used in order to characterise laser ablated areas (roughness, ablation depth) and patterns obtained by photolithography.

(c) *High resolution micro-imager*

Micro imager was developed at the Institute of Nuclear Physics IN2P3-CNRS-ORSAY France [34, 35] and is based on contact imaging through a solid scintillation sheet. The basic principle of these detector is presented in Figure 4 and detailed elsewhere [36, 37]. When an emitted β^- particle or an electron interacts with the detection medium, part of their energy is converted into light. The corresponding light spots are recorded by an electronic system composed of an intensified Charge Coupled Device (CCD) camera, an interface board and a PC. The count and localization by a centroid calculation of each light distribution creates the quantitative cartography of the activity in the sample. The characteristic of the light emitted, which is analysed during the acquisition, depends on the energy of the particle. This property suggests new potential applications in the field of β -rays selection according to their energy.

The full field of view permits spatial resolution around 15 μ m for ^3H and 20 μ m for ^{14}C and ^{35}S . Quantitatively, peptides density was evaluated by grafting ^3H -Lysine instead of RGDC peptide (Figure 2). Radiolabeled lysine grafting was performed incubating (Figure 2, step 3 of the chemical procedure) PET samples in a solution of ^3H -Lys diluted in Lysine solution (10^{-3} M). Radioactivity of this latter solution was adjusted to 6 $\mu\text{Ci/ml}$. Before each analysis, materials are treated in harsh condition by sonicating in water during 1 hour. To evaluate the stability of grafted Lysine in water, the ^3H activity (in cpm/mm 2) was calibrated at each analysis. Calibration of the entire probed area was first done stating the signal corresponding to the activity of ^{14}C standard slides to a constant level. The ^3H radioactive

decay wasn't finally taken into account since its half-life (14 years) is negligible vs. the experiments duration.

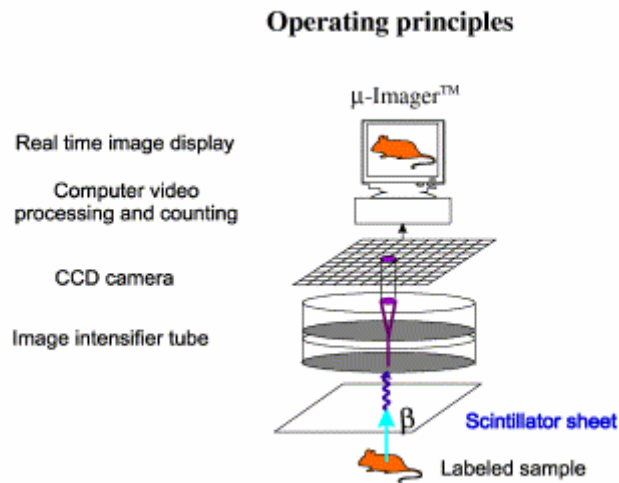


Fig. 4 μ -imager principle.

iii) Evaluation of biological effect on homogeneous or patterned surfaces

(1) Cell culture

MC3T3-E1 (osteoblast-like) cells are a non-transformed cell line established from newborn mouse calvaria and exhibit an osteoblastic phenotype. Cells were grown in *Alpha-MEM* medium supplemented with 10% FBS (Foetal Bovine Serum), 1% penicillin/streptomycin and 1% l-glutamine. Cells were subcultured once a week using trypsin/EDTA and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

(2) Cell attachment

Disks of functionalized polymer were sterilised during 10 min in 70% ethanol and then rinsed three times in PBS. They were placed in 24-wells tissue culture plates (Corning) that had been previously coating with 2% agarose. MC3T3 cells were seeded at a density of 100 000 cells/cm² on each material and allowed to attach for 15 h at 37°C in serum-free α -MEM medium. The positive and negative controls of cell adhesion were the tissue culture polystyrene (TCPS) and agarose (2%) coating, respectively.

(3) Morphological study

(a) *Optical microscope*

Zeiss optical microscope (Axiovert) equipped with an Olympus camera was used to observe cells and patterns obtained by photolithography.

(b) *Fluorescent staining: F-actin filaments and DNA*

Fluorescent staining was performed 15h after cell seeding. Cell loaded materials were rinsed twice with serum free medium, fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) during 15 min at 4°C, and permeabilized with permeabilizing buffer pH= 7.2 (10.3% (w/v) sucrose + 0.292% (w/v) NaCl + 0.06% (w/v) MgCl₂ + 0.476% (w/v) Hepes buffer + 0.5% (v/v) triton-X-100) during 15 min at 4°C.

Cell cytoskeletal filamentous actin (F-actin) was visualized treating the cells with 5 U/mL Alexa Fluor[®] 488 phalloidin for 1 h at 37°C. Cell nuclei were counterstained with 20 µg/ml DAPI (4,6-Diamidina-2-phenylin, Sigma) during 10 min at room temperature. Samples were finally mounted in Vectashield[®].

(c) Scanning Electron Microscopy

Cell morphology was assessed 15 h after cell seeding, by SEM (15 kV using a Hitachi S-2500). Cell loaded materials were rinsed twice with PBS, fixed with 2.5% v/v glutaraldehyde in 0.1 M cacodylic acid buffer (pH= 7.4), and dehydrated in serial diluted ethanol solutions of 30, 50, 70, 80, 90, 95 and 100% v/v. Finally, they were coated by HMDS and dried under vacuum during 2 hours. Prior to observe samples, materials were coated with a sputter coater equipped with a gold target.

3) RESULTS

a) Surface characterization

i) XPS measurements

XPS has been used to monitor each reaction step as it can provide information on chemical bonds and atomic concentrations.

Native PET (Figure 1) exhibits the expected elements as we can principally detect C and O (Table 1). The C_{1s} spectrum principally shows five components present in PET molecule: COOH at 289.3 eV, O-C=O at 288.40 eV, C-O at 286.19 eV, C(C-C=O) at 285eV and C-C at 284.4 eV (Figure 5).

After the first step (Figure 2), XPS analysis shows a decrease of C/O ratio (Table 1) that prove the incorporation of –COOH functions onto PET surface.

As expected (Table 1), N appears after NHS grafting (Figure 2). One new component appears at this step (Figure 6): at 287.6 eV which is characteristic of O=C-N component. Moreover, we can see a decrease of COOH bonds that proved we modified covalently PET surface by NHS grafting instead of carboxylic functions. Indeed, there is a proportional decrease of C-C=O and an increase of N-C=O.

After peptide grafting (Figure 2), XPS analysis confirms the increase of the nitrogen content (Table 1). No great modifications were observed for C_{1s} spectrum after RGDC grafting (Figure 7).

Thus, based upon XPS results, it seems reasonable to say that RGDC peptide grafting effectively takes place following the theoretical scheme but without systematic hanging of the various molecules between them (Figure 2).

Atomic %	C	O	N	C/O	C/N
Native PET (Figure 1)	72.5	27.5	-	2.64	-
Step 1 (Figure 2): PET-COOH	69.5	30.5	-	2.28	-
Step 2 (Figure 2): PET-NHS	68.8	28.2	3	2.44	23
Step 3 (Figure 2): PET-RGDC	69.5	26.2	4.2	2.65	17

Table 1: Experimental atomic composition (%) obtained by XPS analysis in the case of virgin PET, Density 1-COOH, Density 1-NHS and Density 1-RGDC surfaces

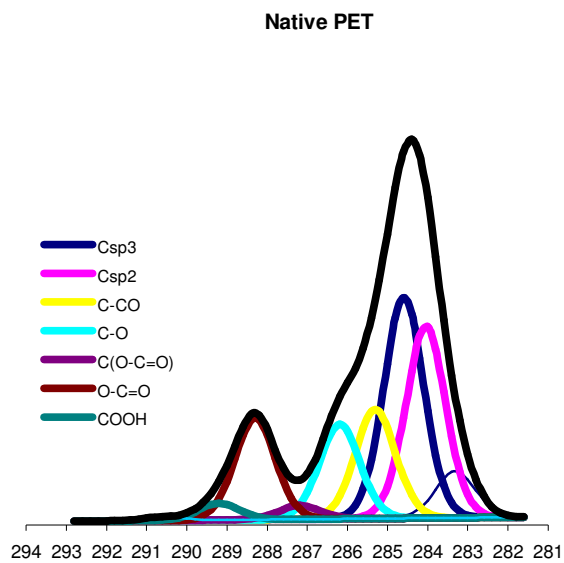


Fig. 5 C_{1s} XPS spectra for Native PET.

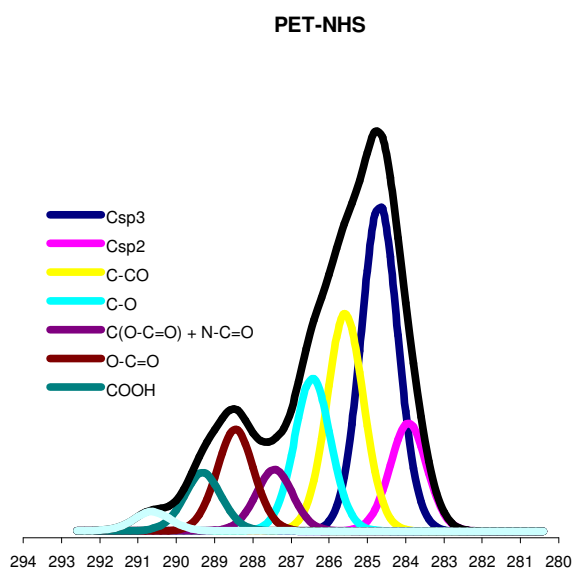


Fig. 6 C_{1s} XPS spectra for material PET-NHS.

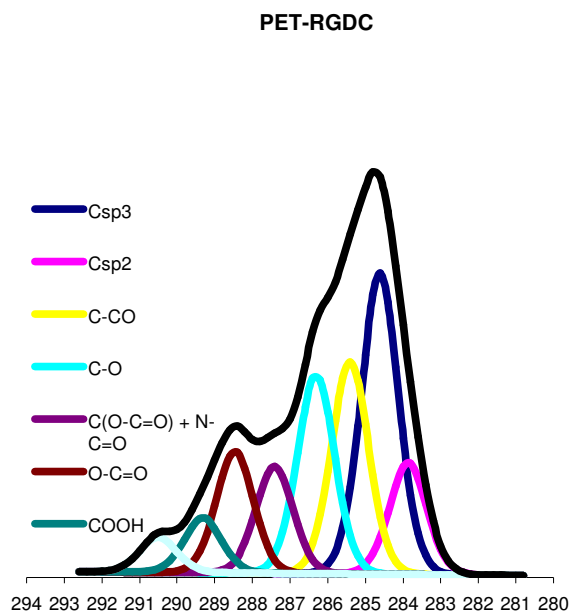


Fig. 7 C_{1s} XPS spectra for material PET-RGDC.

ii) BAM measurements

For RGDC layer onto polymer Brewster angle was evaluated at 60.2° and $n= 1.7$. These indications permitted us to estimate the RGDC layer thickness at 1.5 nm.

iii) High resolution μ -imager

As described in previous works [24], peptides concentration was estimated by grafting 3H -Lys instead of RGDC peptides and hence measuring activity A (in cpm/mm^2) of the as-treated materials by high-resolution μ -imager. Materials are then treated in harsh conditions, by sonicating in water during 1 hour before each analysis, in order to observe a possible decrease of peptides amount (Figure 8). Initial decrease observed of activity represents adsorbed and coated peptides. However after 600 h of washing we observed a stage, we can then say that RGDC concentration obtained represent only grafted molecules. Densities obtained is 1.7 ± 0.3 pmol/ mm^2 . Moreover, high resolution μ -imager gives an information about radiolabelled amino acids distribution on the surface and proves homogeneity of grafting.

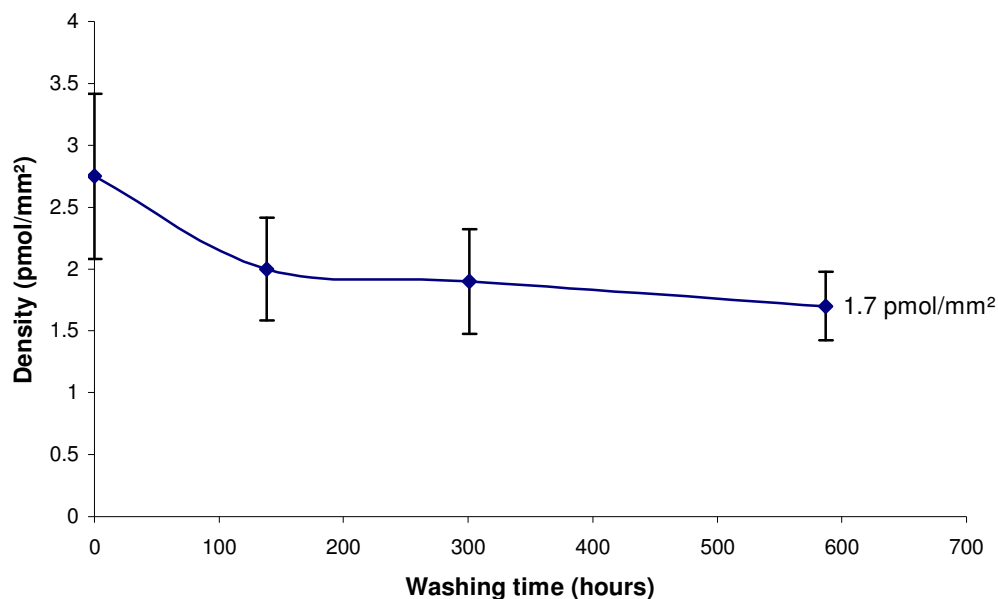


Fig. 8 RGD peptides density after washing in harsh conditions

b) Micro-patterns characterization

i) Patterns created by photolithography

(1) Optical microscope

Optical microscope was used to control photoresist patterns created by first placing mask containing a lithographically defined domains in contact with the photoresist film and exposed to UV light (Figure 9). The geometries obtained are very close to those expected taking into account the mask design. This result induced that photolithography parameters are well controlled (time of UV insolation, time of resist pre-warming, the time of baking, the time of revelation).

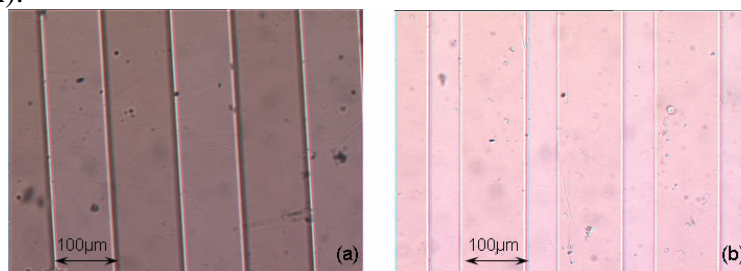


Fig. 9 Pictures obtained by optical microscopy of micro-patterns with a resin-RGD width (μm): (a) 100-100, (b) 100-50.

(2) Optical profilometer

Optical profilometer is used in complement of optical microscope: Figure 10 show 3D pictures of patterns obtained by photolithography. Patterns obtained by this technique are well defined and the different designs are close to the theory. Moreover, photoresist layer appears homogenous with a $1.2\mu\text{m}$ thickness. Opening “windows” grafted with RGD peptides are also homogenous. In agreement with optical microscopy observations (Figure 9), these results seem indicate that photolithography constitute a good route to create RGD micro-patterns on PET surfaces.

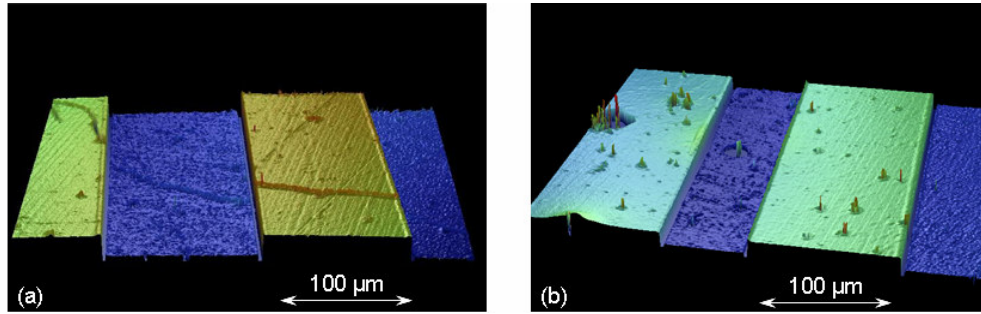


Fig. 10 Pictures obtained by optical profilometer of micro-patterns with a resin-RGD width (μm): (a) 100-100, (b) 100-50.

(3) High resolution micro-imager

After development step, we have to ensure that all resin was removed in the “windows” before grafting. Thus, we used ^3H -Lysine coupled with a high resolution β -imager analysis in order to determine biomolecule distribution on the photolithographic micro-patterns. Picture obtained (Figure 11) show that ^3H -Lysine distribution is in agreement with the one expected in theory.

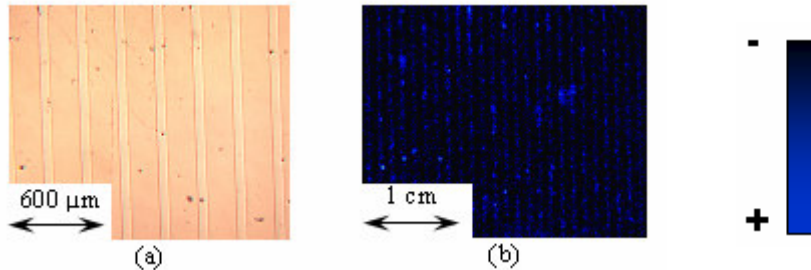


Fig. 11 (a) Optical microscope pictures of photoresist patterns created by first placing a mask containing lithographically defined domains in contact with the photoresist film and exposed to UV light : resin 300 μm -RGD 100 μm (b) PET surfaces patterns, now free of photoresist grafted with ^3H -Lysine. Using micro-imager, we show the localization of ^3H -Lysine onto the defined patterns.

ii) Patterns created by UV excimer laser ablation

(1) Scanning Electron Microscopy

During process of laser ablation, we have to control two main parameters. Firstly, the best image is in the mask conjugated plan position with respect to the lens and we have to determine it experimentally by a z-scan experiment. Secondly, we can vary the number of ablation pulses in order to be sure we removed all RGD peptides from the surface. However, according to the number of pulses used, the material topography can be altered.

Scanning Electron Microscopy permit us to visualize patterns created on the surface with these different parameters.

After several tests described in previous study we chose to work at a distance of $z=0.85\text{mm}$ [30] with 10 pulses. Scanning electron microscopy was used to check if patterns are still well defined (Figure 12) under these conditions.

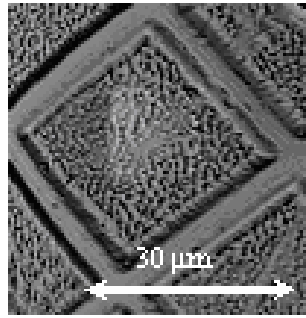


Fig. 12 Picture obtained by Scanning Electron Microscopy for $z = 0.85\text{mm}$.

(2) Optical profilometer

In addition to SEM observations each sample was analysed with optical profilometer in order to control ablation depth (Figure 13) [24].

Excimer ablation of RGDC-grafted PET was performed by varying number of laser pulses (between 1 and 20 pulses) in order to determine ablation depth. It clearly appears that the more the number of pulses increases, the more the ablation depth is important (Figure 14). Optical profilometer permits us to conclude that ablation depth in our work conditions (10 pulses, $z = 0.85\text{ mm}$) was of approximately $1.5\text{ }\mu\text{m}$.

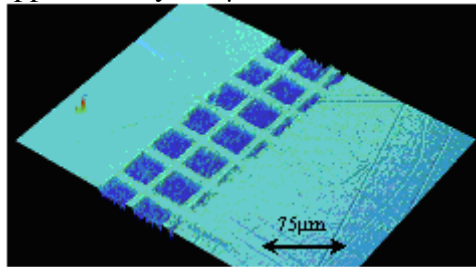


Fig. 13 3D picture (obtained by optical profilometer) of PET-RGDC ablated with 10 laser pulses.

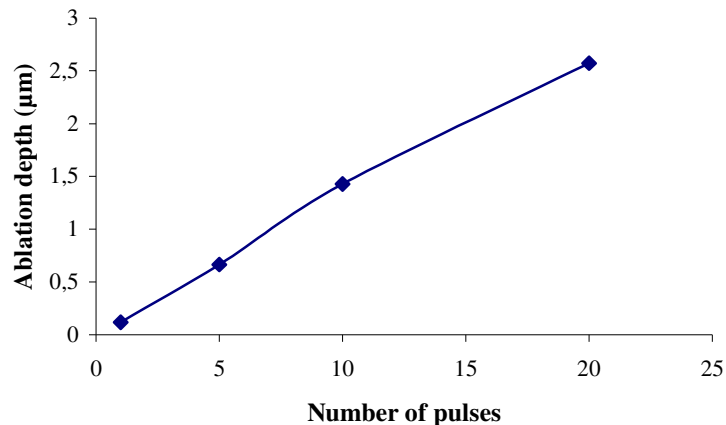


Fig. 14 Ablation depth variation with number of pulses (obtained by optical profilometer).

(3) High resolution micro-imager

High resolution micro-imager was used to ensure the total RGDC removing during laser ablation process. Firstly, PET surface was grafted homogeneously by ^3H -Lysine instead of RGDC. Then, laser ablation was performed on this surface in order to remove ^3H -Lysine from the surface with well defined design. Picture obtained by high resolution micro-imager (Figure 15) clearly show two different areas onto the surface: (i) blue area which means there

is radioactivity on the surface and (ii) black stripes which indicate there is a radioactivity removing on well defined areas.

This result permit to conclude about the feasibility of laser ablation to control RGDC distribution on PET surface.

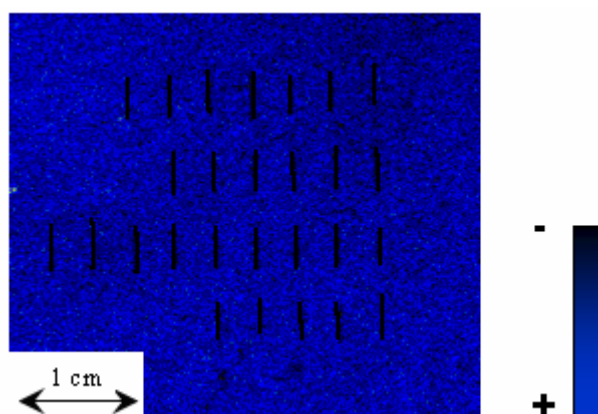


Fig. 15 Picture of PET-RGDC ablated by laser excimer obtained by high resolution micro-imager; black lines provided from ablation of ^3H -Lysine grafted instead of RGDC.

c) *Biological evaluation*

i) **Homogeneous surfaces**

Firstly, cell attachment tests were carried out on homogenous surfaces grafted with RGD peptides. The potential of these RGDC peptides to promote cells adhesion to PET was investigated by morphological study, using mouse osteoblastic cells (MC3T3).

(1) Optical microscopy

Optical microscope pictures of MC3T3 15h after seeding on native PET (Figure 16-(a)) and on PET-RGDC (Figure 16-(b)) show a clear difference of morphology. Cells seeded onto native PET stay round on the surface in opposition with cells seeded onto PET-RGDC material. In this case, cells are well attached and spread.

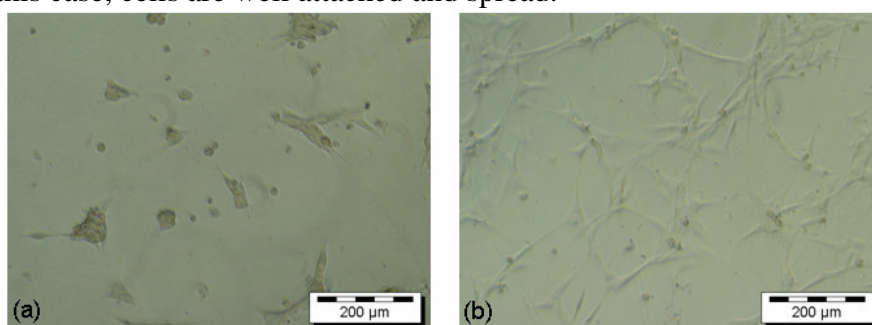


Fig. 16 Pictures obtained by optical microscopy of MC3T3 cells 15h after seeding in serum free medium on: (a) Native PET, PET-RGDC (b).

(2) Scanning Electron Microscopy

In order to supplement optical microscopy study, we used SEM to observe MC3T3 cells seeded on native polymer (Figure 17-(a)) and on RGDC modified material (Figure 17-(b)). These results are perfectly in agreement with those obtained previously by optical microscopy. In the case of native PET (Figure 17-(a)), we can observe a retraction of cell

which seems indicate that it doesn't like the host surface. In opposition cells seeded onto RGD modified polymer are well spread (Figure 17-(b)). Moreover, cells seeded on RGD modified material appeared to show secretions on the surface of their membrane suggesting some kind of metabolic activity (Figure 17-(b)).

Morphological studies of cells seeded on homogeneous surfaces modified or not by RGD proved the potential of these RGDC peptides to promote cells adhesion.

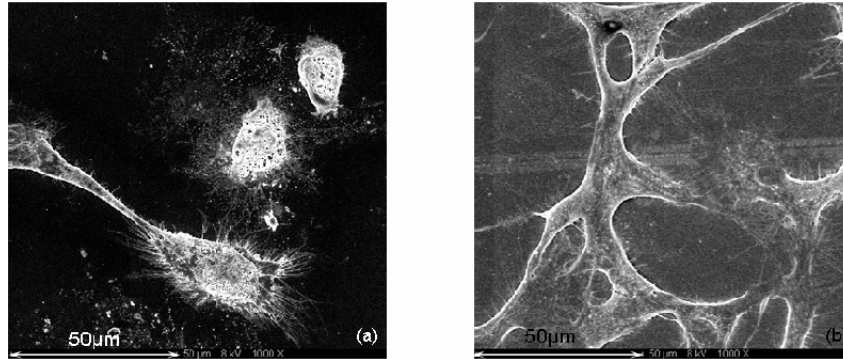


Fig. 17 Pictures obtained by Scanning Electron Microscopy of MC3T3 cells 15h after seeding in serum free medium on: (a) Native PET, PET-RGDC (b).

ii) Patterned surfaces

The second way of this study consisted on seeding of MC3T3 on patterned surface in order to validate the efficiency of these two methods to create RGD micro-patterned and to study their effects on cell adhesion.

(1) Photolithography

(a) *Optical microscopy*

Microdomains of variable width were elaborate (“non RGD-RGD” width (μm) of (a)-100-100, (b)-100-50). The figure shows the adhesion of cells (MC3T3 cells after a 15 h seeding period) on the surface of these materials.

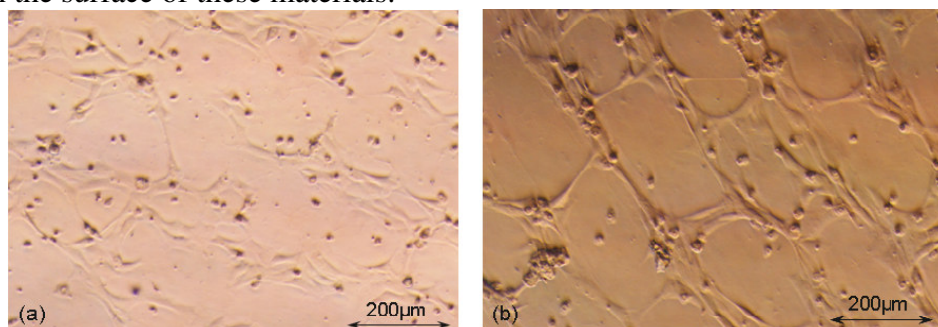


Fig. 18 Pictures obtained by optical microscopy of MC3T3 15h after seeding in serum free medium onto micro-patterns created by photolithography with a “non RGD-RGD” width (μm): (a) 100-100, (b) 100-50.

Figure 18 shows an alignment of cells onto RGD lines, and that, whatever the pattern size. Nevertheless, lower is the width of RGD and higher is the cell lengthening into microgrooves.

(b) *Fluorescent staining:F-actin filaments and DNA*

Fluorescent staining was used to confirm results obtained by optical microscopy. We chose to stain F-actin filaments and DNA to have an idea of cell organisation onto the micro-patterned surface.

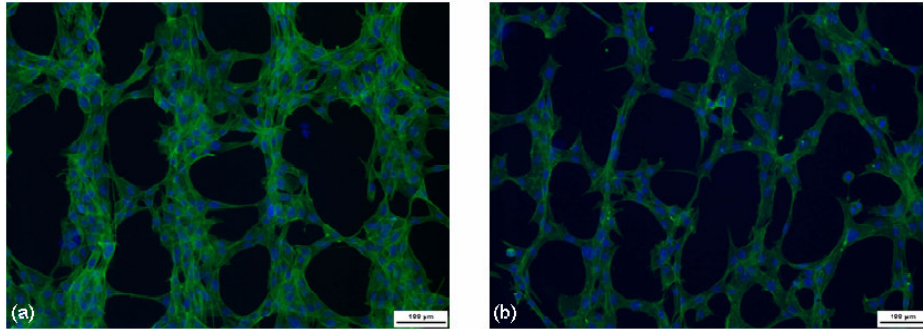


Fig. 19 Pictures obtained by fluorescence microscopy of MC3T3 15h after seeding in serum free medium (F-actin filaments in green and nuclei in blue) onto micro-patterns created by photolithography with a “non RGD-RGD” width (μm): (a) 100-100, (b) 100-50.

Figure 19 represents pictures obtained by fluorescence microscopy of cells 15h after seeding onto RGD patterned PET. We can observe an alignment of cells in RGD grooves and the ability of cells to bind between them.

(2) UV excimer laser ablation

(a) *Optical microscope*

The optical micrographs of four types of laser microfabricated surfaces (a–d) presenting micro-patterns with a “RGD width”-“ablation width”-“ablation depth” (μm) of (a)-25-75-1.2, (b)-85-75-1.2, (c)-125-75-1.2 and (d)-325-75-1.2., after a 15 h seeding period with the MC3T3 cells, are shown in Figure 20 (a-d).

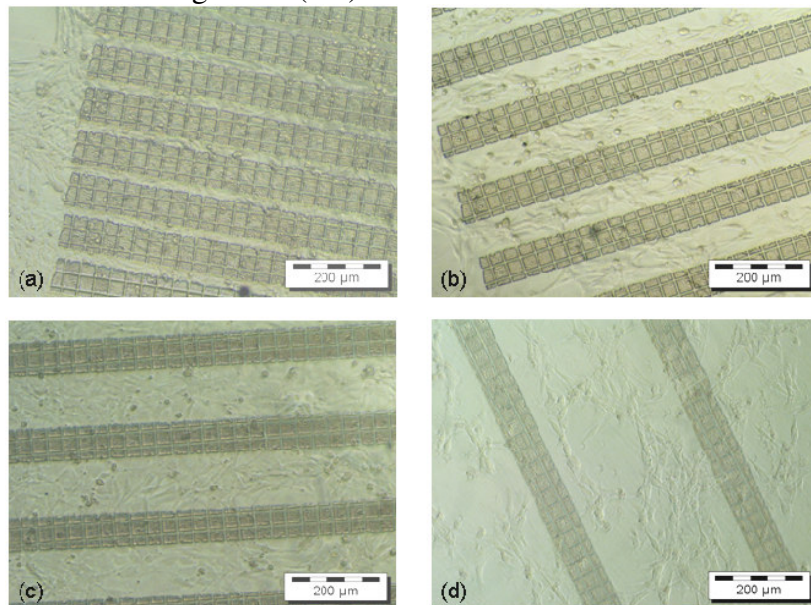


Fig. 20 Pictures obtained by Optical Microscopy of MC3T3 15h after seeding onto micro-patterned surfaces with a RGD width-ablation width-ablation depth (μm); (a)= 25-75-1.2, (b)= 85-75-1.2, (c)= 125-75-1.2 and (d)= 325-75-1.2.

Whatever the size of the pattern carried out, the cells seem to be aligned in the RGD functionalized area.

(b) *Scanning Electron Microscopy*

The scanning electron micrographs of micro-patterns with a RGD width of $5\mu\text{m}$ and $85\mu\text{m}$, after a 15 h seeding period with the MC3T3 cells, are respectively shown in Figure 21-(a) and Figure 21-(b-c). In all pictures, we can observe that cells are aligned onto RGD

patterns and not on ablated areas. That is perfectly expressed on Figure 21-(a) where we can notice the cell perfectly aligned on the 5 μ m RGD area. Figure 21-(a) and (c) show an orientation of cells on the inter-ablated spacing. The latter appeared to be connecting by extending pseudopods towards each other.

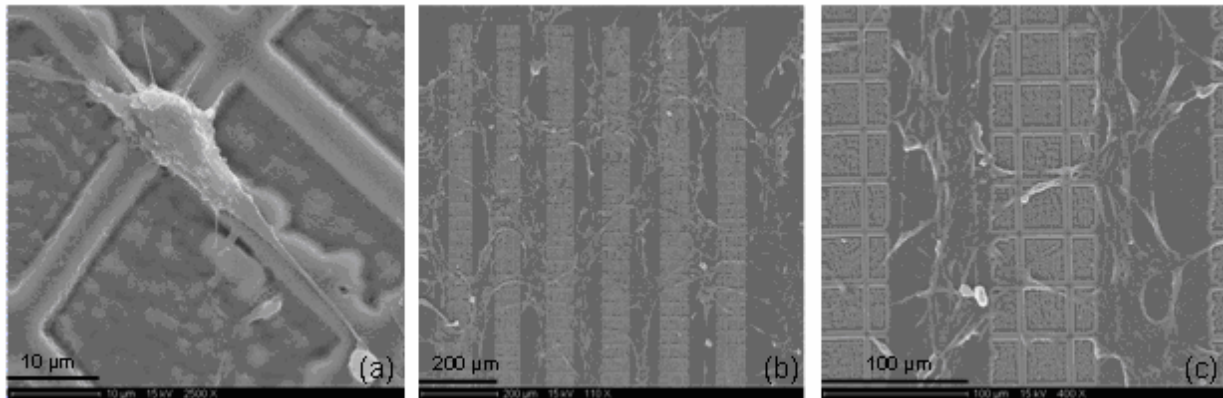


Fig. 21 Pictures obtained by Scanning Electron Microscopy of MC3T3 15h after seeding onto micro-patterned surfaces with a spacing (μ m); (a)-5, (b)= 85, (c)= 85.

4) Discussion:

In order to avoid the problems related to biomaterials use (such as inflammation, infections, aseptic loosening, local tissue waste, and implant encapsulation as well as thrombosis and embolization), a new route consist on association of biomaterials and autologous cell before implantation. However, this hybrid material concept requires a perfect cooperation between biomaterials and the cells that will colonise it. One of the main approaches to improve biomaterials is to modify their surface by immobilization of cell recognition ligands to obtain controlled interactions between cells and synthetic substrates.

In 1984, a tetrapeptidic sequence of the fibronectine was recognized for its functions of cellular recognition: Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) [8]. But it was established subsequently that the RGD sequence was the minimum functional unit allowing the conservation of the activity of cell attachment. Since this discovery, number of studies has proved that immobilization of adhesive peptides on materials enhance endothelial [38-40] and osteoblast [18, 20, 41-43] cells adhesion. Much effort has been devoted to ensure stability of the peptide bonding and accessibility to active sites through physical adsorption and chemical binding. Physical adsorption may not be successful in promoting long-term implantation because of the risk of desorption and/or exchange or difficulties in controlling the presentation of the active sequence towards target cells. Moreover, physical adsorption doesn't permit to control exactly peptide density deposited on the surface. However the knowledge of the density is a major element in the comprehension of the ligand-receptor interactions. Massia and Hubbell shown in 1991 that the minimal density needed on the surface to improve cell adhesion was 1 fmol/cm². However, in their studies Massia and Hubbell grafted GRGDY peptides onto poorly adhesive glass substrates and observed human foreskin fibroblasts adhesion. Moreover, they used iodination of tyrosine (¹²⁵I-Tyr) coupled with γ counter analysis to evaluate peptide density on the surface but this technique didn't permit them to conclude about homogeneity of their grafting. Thus, it's not possible to compare our results with those obtained in their studies because of the use of different cells, different peptides, different substrate and different peptides quantification technique. In our study RGD density on

homogeneous surfaces was evaluate by high resolution micro-imager at 1.7 ± 0.3 pmol/mm² [23, 44, 45].

Today, the current consensus, agreed by many research teams throughout the world is to distribute the bioactive ligands in a controlled fashion in the form of nanodomains or microdomains and no longer in an homogeneous or a statistically based way.

This last few years, microfabrication techniques combined with surface chemistry and material science knowledge has provided new tools to explore, *in vitro*, the interactions of cells with their environment. Indeed, the ability to produce patterns of single or multiple cells through precise surface engineering of cell culture substrates has promoted the development of cellular bioassays that provide entirely new insights into the factors that control cell adhesion to material surfaces, cell proliferation, differentiation and molecular signaling pathways. There exists nowadays several methodologies that permit to generate biological micro-patterns on materials but most of studies used soft lithography techniques, such as Micro-Contact Printing (MCP) [46, 47] , microfluidic patterning [48, 49] or micromolding [50]. However, MCP is by far the most used technique to create biological micropatterns. Thanks to this technique, there is a wide range of approaches to directly pattern materials with cell adhesion promoting molecules. The list of applicable adhesion promoting molecules is long. In most cases different extra-cellular matrix (ECM) proteins or synthetic peptide constructs with ECM binding sites have been printed. For example, Bernard et al. stamped different model proteins such as immunoglobulins, BSA, and NgCAM [51]. In the same way, endothelial and several other cell types have been patterned using fibronectin [52-54]. However, soft lithographic techniques used Self Assembled Monolayer's (SAM's) to immobilize biomolecules on the material surfaces, so molecules are not covalently grafted onto biomaterial. However, the stability of the molecular patterns that are not covalently bound to the underlying substrate may not be sufficient for longer-term cell-biological studies. Moreover, SAM's generally use alkanethiolate which present a limited stability to oxidation.

The aim of this study was to create micro-patterns by two different techniques. The first one purposes to create micro-patterns by UV excimer laser photoablation of PET covalently grafted by RGD peptides. Briefly, RGD peptides are first grafted onto PET and then they are removed by laser ablation with well controlled fashion. The second one is a technique currently used in microelectronic, the photolithography. Basically, patterns are created by photolithography and then RGD peptides are covalently grafted onto micro-patterned PET with desired design.

a) Photolithography

Photolithography is a technique currently used in electronic manufacturing for its low cost and its wide range of designs. However, this technique has quickly been adapted for biological application. For example, Veishe et al. used photolithography to immobilize proteins on gold surfaces in order to enhance cell adhesion [55]. By this study they proved the ability of the engineered surfaces to guide cell adhesion. However, the use of solvents during lift-off process can be a disadvantage when proteins are used. Indeed, protein can be denaturated and lost their biological activity. A solution can then be the use of short peptides which are more stable than protein [56].

In this paper, we chose to covalently graft RGD peptides onto photolithographic micro-patterns presenting two different designs but the ability to create numerous designs has been described previously [30].

Photolithography process is composed by several steps: (1) coating of photoresist, (2) UV irradiation, (3) development and (4) baking. After this last step, the surface is composed of patterns with “windows” providing access to the substrate (PET) and a background protected with resin, the grafting can then be occurred. However, we have to ensure that all resin was removed in the “windows” before grafting. Patterns are thus controlled just after resin removing by optical microscope (Figure 9) and then by optical profilometer (Figure 10). Pictures obtained with these two techniques show that patterns are well defined and are closed to mask designs. Then, we grafted ^3H -Lysine on micro-patterns in order to mimic RGD grafting and we observed materials with high resolution micro-imager. Figure 11 show a comparison between patterns observed by optical microscope and by micro-imager. As expected, ^3H -Lysine patterning correspond to those obtained by optical microscope. This result proves efficiency of biomolecule grafting inside photolithographic “windows”.

Thus, a second step consisted on evaluation of cell attachment onto patterns obtained by photolithography. Figure 9 and Figure 10 show pictures, obtained respectively by optical microscope and by fluorescence microscope, of MC3T3 15h after seeding on RGD patterned polymer. Whatever the size of the pattern, cell appeared to be connecting by extending pseudopods towards each other. We can see an alignment of cell on RGD lines, nevertheless cells seem more spread when there adhere on larger RGD domain. However, lower is the RGD groove width and higher is the cell orientation. This result is in agreement with those previously demonstrated in literature: indeed, Clark et al. proved when the grooves or ridges are appreciably wider than the cells effects on orientation are not very marked [57].

b) UV excimer laser ablation

UV excimer laser ablation is another way to create micro-patterns onto PET grafted with RGD peptides. This method doesn't require use of organic solvent that preserve integrity of peptides. However, we have to ensure that all RGD peptides layer is removed during ablation, thus ablation depth was determined in function of pulses number by optical profilometer. As we can see on Figure 14, with 10 pulses we ablated a thickness of 1.5 μm that is sufficient to remove all peptides (RGD layer = 1,5 nm obtained by BAM measurements). This result was validated by grafting of ^3H -Lysine instead of RGD peptides before ablation. After laser treatment we can see areas without RGD peptides on the surface (Figure 15) that prove efficiency of this technique.

In this study, MC3T3 cells were seeded onto ablated materials and observed by optical microscopy and SEM after 15h of culture. Figure 20 shows pictures representing cells seeded on three different patterns. In all cases we can see that cells are exclusively attached on RGD areas. Moreover, cell spreading seems depend on RGD layer width. Indeed, the best alignment occurs for RGD width ranging between 25 μm and 125 μm .

However, laser treatment of PET has physical and chemical consequences which have been studied for few years [58, 59]. For example, laser ablation is able to change the surface properties of the material and consequently modify platelet adhesion and cell behaviour [60, 61]. It subsequently appears predictable that the physico-chemical modifications of surface will influence the interactions between the cells and the substrate. Indeed, numerous studies proved the effect of roughness [62-64] and hydrophilicity [65, 66] of material surface on cell behavior.

Indeed, laser ablation create various kind of oxidized groups, caused by decomposition of peroxides by laser pulses, on the PET surface [60] and these group are known to modify cell adhesion [67, 68]. But, laser ablation also modify material topography creating microgrooves on the surface, that can affect cell response [27, 69]. Duncan et al. used laser excimer beam technology to create PET surfaces with well defined 3-D microdomains in order to study Human Osteoblast Progenitor (HOP) cells growth [70]. They proved that HOP adhered

preferentially on surfaces with “smooth” microtopographical transitions (i.e. minimal microgroove width and depth). Their results show that the grooves appeared to inhibit cell adhesion but this surface topography effect could not be dissociated from possible surface chemistry effect.

In our study, one question can occur: cell alignment is it due to RGD grafting or to laser induced topography/chemistry? Britland et al. [71] studied this question using a chemical cue (laminin) oriented at right angles to a topographic one. When the grooves were 500nm deep or less, the cells reacted chiefly to the chemical cue. On deeper grooves (5 μ m depth) the topographic effect oriented about 80% of cells and the chemical one 7%. This result confirmed those obtained by Clark et al [57].

In our study, grooves depth is less than 1.5 μ m that wouldnt't be sufficient to oriente cell adhesion in agreement with results obtained by Britland et al. and by Clark et al. even if the cells their used were different. Indeed, they studied BHK (Baby Hamster Kidney), MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) and chick embryo cerebral neurones and they proved that cell behavior on patterned surfaces can be different in function of cell line used.

Moreover, these results are similar with those obtained using photolithography. These results seem sufficient to conclude that cell alignment on modified PET is due to the presence of RGD peptides which enhance cell adhesion.

The main objective of this paper was to compare two different methods permitting to create RGD micro-patterns on PET surface. We chose to study adhesion of MC3T3 cells on RGD grafted materials micro-patterned by use of photolithography or UV excimer laser ablation. In all cases, biological results are the same: cells exhibit an alignment on RGD areas and appear to be connecting and that whatever the space between RGD domains. However, the size of pattern (width of RGD layer) seems to be a very important parameter. Indeed, Figure 18 and Figure 19 prove, in the case of patterns obtained by photolithography, that cell spreading is better with a 100 μ m RGD width. This result is confirmed on Figure 20 and Figure 21. Indeed, in the case of patterns created by photoablation the best alignment occurs for RGD thickness of 85 μ m. However, these results are valid only with the use of MC3T3 cells because cell response onto micro-patterned surfaces depends clearly on cell type size. Indeed, Meyle et al. studied cell growth of a variety of cell types on a micro-textured silica surfaces and showed the effect of cell orientation to be cell-type dependent [72].

5) CONCLUSION

A three-step reaction procedure was developed to attach RGD-containing peptides onto PET surface with controlled density in order to clarify the capacity of RGD peptides to interact with integrin receptors to promote cell adhesion. The surface modifications, the presence of different chemical elements and the covalent immobilization of RGD-sequence peptides onto the surface of PET were confirmed by the XPS analysis. Peptide density was evaluated by high resolution μ -imager at [RGDC]=1.7 pmol/mm² that is seemed sufficient to improve osteoblastic cells adhesion. Micro-patterns were created onto polymer surface using two different ways: photolithography and UV excimer ablation laser. These patterns were characterised by optical microscopy, scanning electron microscopy, optical profilometry and high resolution μ -imager. The biological evaluation of micro-patterned surfaces was done by studying adhesion of MC3T3 in serum free conditions during 15h. Opical microscopy, scanning electron microscopy and fluorescence microscopy were used to observe cell morphology. Whatever the technique used to create micro-patterns a cell alignment occurs for RGD thickness around 100 μ m. This work will be completed by mineralization studies and by elaboration of bi-functionalized surfaces. Indeed, bone growth and remodelling depend on

complex interactions occurring between osteoblasts and other cells present, particularly vascular endothelial cells that may be pivotal member of a complex interactive communication network in the bone [73, 74]. Future prospects would deal with realisation of surface grafted in one hand with RGD peptides to enhance osteoblasts adhesion and in other hand with YIGSR peptides to enhance endothelial cell adhesion in order to improve material osteointegration.

6) ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank B. Desbat for Brewster Angle Microscopy measurements (Institut des Sciences Moléculaires, UMR 5255, Université Bordeaux 1, 351 cours de la Libération - 33405 Talence cedex France).

7) REFERENCES

1. Ma Z, Kotaki M, Yong T, He W, Ramakrishna S. Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. *Biomaterials*. 2005;26(15):2527-36.
2. Gappa-Fahlenkamp H, Lewis RS. Improved hemocompatibility of poly(ethylene terephthalate) modified with various thiol-containing groups. *Biomaterials*. 2005;26(17):3479-85.
3. Klinge U, Klosterhalfen B, Ottinger AP, Junge K, Schumpelick V. PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes. *Biomaterials*. 2002;23(16):3487-93.
4. Klee D, Ademovic Z, Bosserhoff A, Hoecker H, Maziolis G, Erli H-J. Surface modification of poly(vinylidene fluoride) to improve the osteoblast adhesion. *Biomaterials*. 2003;24(21):3663-70.
5. Mikulikova R, Moritz S, Gumpenberger T, Olbrich M, Romanin C, Bacakova L, et al. Cell microarrays on photochemically modified polytetrafluoroethylene. *Biomaterials*. 2005;26(27):5572-80.
6. Blanchemain N, Haulon S, Martel B, Traisnel M, Morcellet M, Hildebrand HF. Vascular PET Prostheses Surface Modification with Cyclodextrin Coating: Development of a New Drug Delivery System. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2005;29(6):628-32.
7. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 2002;110(6):673-87.
8. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 1984;309(5963):30-3.
9. Baquey C, Palumbo F, Porte-Durrieu MC, Legeay G, Tressaud A, d'Agostino R. Plasma treatment of expanded PTFE offers a way to a biofunctionalization of its surface. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 1999;151(1-4):255-62.
10. Massia SP, Hubbell JA. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1991 1991/2;25(2):223-42.
11. Hubbell JA, Massia SP, Drumheller PD. Surface-grafted cell-binding peptides in tissue engineering of the vascular graft. *Ann New York Acad Sci*. 1992;665:253-8.

12. Massia SP, Stephen P, Hubbell JA. Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. *Analytical Biochemistry*. 1990 1990/6;187(2):292-301.
13. Hubbell JA, Massia SP, Desai NP, Drumheller PD. Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. *Biotechnology*. 1991;9(6):568-72.
14. Massia SP, Hubbell JA. Covalently attached GRGD on polymer surfaces promotes biospecific adhesion of mammalian cells. *Ann New York Acad Sci*. 1990;589:261-70.
15. Porté-Durrieu MC, Labrugère C, Villars F, Lefebvre F, Dutoya S, Guette A, et al. Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces: XPS characterization and human endothelial cell interactions. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999;46(3):368-75.
16. Durrieu M-C. Conception, élaboration et caractérisation de matériaux bioactifs. *ITBM-RBM*. 2005 2005/6;26(3):229-37.
17. Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, Bareille R, Amedée J. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *Journal of materials science: materials in medicine*. 2004;15:779-86.
18. Bartouilh de Taillac L, Porte-Durrieu MC, Labrugere C, Bareille R, Amedee J, Baquey C. Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation. *Composites Science and Technology*. 2004 2004/5;64(6):827-37.
19. Pallu S, Bourget C, Bareille R, Labrugere C, Dard M, Sewing A, et al. The effect of cyclo-DfKRG peptide immobilization on titanium on the adhesion and differentiation of human osteoprogenitor cells. *Biomaterials*. 2005 2005/12;26(34):6932-40.
20. Porte-Durrieu MC, Guillemot F, Pallu S, Labrugere C, Brouillaud B, Bareille R, et al. Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials*. 2004 2004/8;25(19):4837-46.
21. Michael KE, Vernekar VN, Keselowsky BG, Meredith JC, Latour RA, Garcia AJ. Adsorption-Induced Conformational Changes in Fibronectin Due to Interactions with Well-Defined Surface Chemistries. *Langmuir*. 2003;19(19):8033-40.
22. Healy KE, Thomas CH, Rezanian A, Kim JE, McKeown PJ, Lom B, et al. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials*. 1996;17(2):195-208.
23. Maheshwari G BG, Lauffenburger DA, Wells A, Griffith LG. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *Journal of Cell Science*. 2000;113:1677-86.

24. Chollet C, Lazare S, Brouillaud B, Labrugere C, Bareille R, Durrieu MC. RGD Peptide Grafting onto micro-patterned PET: Peptide distribution impact on cell attachment. *Journal of Laser micro/nano engineering*. 2006;1(3):226-30.
25. Biltresse S, Attolini M, Marchand-Brynaert J. Cell adhesive PET membranes by surface grafting of RGD peptidomimetics. *Biomaterials*. 2005;26(22):4576-87.
26. Sawyer AA, Weeks DM, Kelpke SS, McCracken MS, Bellis SL. The effect of the addition of a polyglutamate motif to RGD on peptide tethering to hydroxyapatite and the promotion of mesenchymal stem cell adhesion. *Biomaterials*. 2005 2005/12;26(34):7046-56.
27. Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials*. 1997 1997/12;18(24):1573-83.
28. Brunette DM. Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. *Experimental Cell Research*. 1986;164(1):11-26.
29. Hamilton DW, Brunette DM. "Gap guidance" of fibroblasts and epithelial cells by discontinuous edged surfaces. *Experimental Cell Research*. 2005;309(2):429-37.
30. Chollet C, Lazare S, Labrugère C, Guillemot F, Bareille R, Durrieu MC. RGD micro-patterning on Poly(ethylene terephthalate) surfaces. *ITBM-RBM*. 2007;to be published.
31. Chollet C, Chanseau C, Brouillaud B, Durrieu MC. RGD Peptide Grafting onto Poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities. *Biomolecular Engineering*. 2007;to be published.
32. Chollet C, Labrugère C, Guignandon A, Chanseau C, Durrieu MC. RGD Peptide Grafting onto Poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities: Physico-chemical and biological characterisation. *Biomaterials*. 2007;submitted for publication.
33. Weisbuch F, Tokarev VN, Lazare S, Belin C, Bruneel JL. Millimeter long PMMA nanofibers--a new form of material removal in laser ablation. *Thin Solid Films*. 2004;453-454:394-8.
34. Charon Y, Laniece P, Bendali M, Gaillard JM, Leblanc M, Mastrippolito R, et al. A self triggered intensified CCD (STIC). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. 1991 1991/12/1;310(1-2):379-84.
35. Crumeyrolle-Arias M, Jafarian-Tehrani M, Cardona A, Edelman L, Roux P, Laniece P, et al. Radioimagers as an alternative to film autoradiography for in situ quantitative analysis of I-ligand receptor binding and pharmacological studies. *Histochemical Journal*. 1996;28(11):801-9.

36. Barthe N, Coulon P, Hennion C, Ducassou D, Basse-Cathalinat B, Charpak G. Optimization of a new scintillation gas detector used to localize electrons emitted by Tc. *Journal of Nuclear Medicine*. 1999;40(5):868-75.
37. Laniece P, Charon Y, Dumas S, Mastrippolito R, Pinot L, Tricoire H, et al. HRRI: A high resolution radioimager for fast, direct quantification in in situ hybridization experiments. *BioTechniques*. 1994;17(2):338-45.
38. Massia SP, Hubbell JA. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1991;25(2):223-42.
39. Garland W, Fussell SLC. Endothelial cell adhesion on RGD-containing methacrylate terpolymers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2004 Jun 2004;70A(2):265-73.
40. Kouvroutoglou S, Dee KC, Bizios R, McIntire LV, Zygourakis K. Endothelial cell migration on surfaces modified with immobilized adhesive peptides. *Biomaterials*. 2000;21(17):1725-33.
41. Martin Kantlehner PS, Dirk Finsinger, Jörg Meyer, Alfred Jonczyk, Beate Diefenbach, Berthold Nies, Günter Hölzemann, Simon L. Goodman, Horst Kessler. Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as well as Bone Formation. *ChemBioChem*. 2001;1:107-14.
42. Suh-Chin Wu J-CYS-hHDCC. Artificial extracellular matrix proteins contain heparin-binding and RGD-containing domains to improve osteoblast-like cell attachment and growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006;79A(3):557-65.
43. Huang H, Zhao, Y., Liu, Z., Zhang, Y., Zhang, H., Fu, T., Ma, X. Enhanced osteoblast functions on RGD immobilized surface. *The Journal of oral implantology* 2003;29(2):73-9.
44. Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz J. Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics are Regulated by Spacing of Integrin Ligands. *Biophys J*. 2007 Feb 2.
45. Koo LY, Irvine DJ, Mayes AM, Lauffenburger DA, Griffith LG. Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus. *J Cell Sci*. 2002 Apr 1;115(Pt 7):1423-33.
46. Bo Wang JFCG. Printing Biomacromolecules on a Bovine Serum Albumin Precursor Layer. *Macromolecular Bioscience*. 2005;5(8):767-74.
47. Tom T. Huang TG, Demir Akin, Woo-Jin Chang, Jennifer Sturgis, Rashid Bashir, Arun K. Bhunia, J. Paul Robinson, Michael R. Ladisch. Micro-assembly of functionalized particulate monolayer on C18 derivatized SiO surfaces. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003;83(4):416-27.

48. Kim YD, Park CB, Clark DS. Stable sol-gel microstructured and microfluidic networks for protein patterning. *Biotechnology and Bioengineering*. 2001;73(5):331-7.
49. Miller JS, Béthencourt MI, Hahn M, Lee TR, West JL. Laser-scanning lithography (LSL) for the soft lithographic patterning of cell-adhesive self-assembled monolayers. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006;93(6):1060-8.
50. Khademhosseini A, Eng G, Yeh J, Fukuda J, I. JBII, Langer R, et al. Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006;79 A(3):522-32.
51. Bernard A, Delamarche E, Schmid H, Michel B, Bosshard HR, Biebuyck H. Printing Patterns of Proteins. *Langmuir*. 1998;14(9):2225-9.
52. Csucs G, Michel R, Lussi JW, Textor M, Danuser G. Microcontact printing of novel co-polymers in combination with proteins for cell-biological applications. *Biomaterials*. 2003;24(10):1713-20.
53. Lance Kam SGB. Cell adhesion to protein-micropatterned-supported lipid bilayer membranes. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;55(4):487-95.
54. James CD, Davis RC, Kam L, Craighead HG, Isaacson M, Turner JN, et al. Patterned Protein Layers on Solid Substrates by Thin Stamp Microcontact Printing. *Langmuir*. 1998;14(4):741-4.
55. Veisheh M, Wickes BT, Castner DG, Zhang M. Guided cell patterning on gold-silicon dioxide substrates by surface molecular engineering. *Biomaterials*. 2004;25(16):3315-24.
56. Ito K, Imanishi. Materials for enhancing cell adhesion by immobilization of cell-adhesive peptide. *Journal of biomedical materials research*. 1991 1991;25:1325-37.
57. Clark P, Connolly P, Curtis AS, Dow JA, Wilkinson CD. Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata. *Development*. 1990 April 1, 1990;108(4):635-44.
58. Duncan AC, Lazare S, Baquey C. Use of biological nanoprobe for the characterization of micropatterned surfaces obtained by ultraviolet laser lithography. *Applied Surface Science*. 2004 2004/1/15;221(1-4):93-8.
59. Mayer G, Blanchemain N, Dupas-Bruzek C, Miri V, Traisnel M, Gengembre L, et al. Physico-chemical and biological evaluation of excimer laser irradiated polyethylene terephthalate (pet) surfaces. *Biomaterials*. 2006 2006/2;27(4):553-66.
60. Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N, Daliri M. Cell behavior on laser surface-modified polyethylene terephthalate in vitro. *Journal Of Biomedical Materials Research*. 2001;57(2):183-9.

61. Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N, Salehian P. In vitro studies of platelet adhesion on laser-treated polyethylene terephthalate surface. *Journal Of Biomedical Materials Research*. 2001;54(4):540-6.
62. Montanaro L, Arciola CR, Campoccia D, Cervellati M. In vitro effects on MG63 osteoblast-like cells following contact with two roughness-differing fluorohydroxyapatite-coated titanium alloys. *Biomaterials*. 2002 Sep;23(17):3651-9.
63. Hamilton DW, Brunette DM. The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. *Biomaterials*. 2007 Apr;28(10):1806-19.
64. Degasne I, M. F. Baslé * VD, Huré G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, et al. Effects of Roughness, Fibronectin and Vitronectin on Attachment, Spreading, and Proliferation of Human Osteoblast-Like Cells (Saos-2) on Titanium Surfaces. *Calcified Tissue International*. 1999;64(6):499-507.
65. Ken Webb VHPAT. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998;41(3):422-30.
66. Dewez JL, Berger VV, Schneider YJ, Rouxhet PG. Influence of Substrate Hydrophobicity on the Adsorption of Collagen in the Presence of Pluronic F68, Albumin, or Calf Serum. *J Colloid Interface Sci*. 1997 Jul 1;191(1):1-10.
67. Faucheux N, Tzoneva R, Nagel M-D, Groth T. The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry. *Biomaterials*. 2006;27(2):234-45.
68. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJAJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials*. 2004;25(28):5947-54.
69. Anselme K, Bigerelle M. Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomaterialia*. 2005 2005/3;1(2):211-22.
70. Duncan AC, Weisbuch F, Rouais F, Lazare S, Baquey C. Laser microfabricated model surfaces for controlled cell growth. *Biosensors and Bioelectronics*. 2002;17(5):413-26.
71. Britland S, Morgan H, Wojciak-Stodart B, Riehle M, Curtis A, Wilkinson C. Synergistic and Hierarchical Adhesive and Topographic Guidance of BHK Cells. *Experimental Cell Research*. 1996 1996/11/1;228(2):313-25.
72. J. Meyle KGWN. Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1995;29(1):81-8.

73. Villars F, Bordenave L, Bareille R, Amedee J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem.* 2000 Sep 14;79(4):672-85.

74. Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Apr;282(4):C775-85.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le but de développer des biomatériaux innovants, la stratégie retenue dans cette étude s'inscrit dans le concept de matériaux hybrides qui se propose d'associer une composante artificielle (le matériau) et une composante cellulaire (cellules autologues du patient). Dans le but de favoriser l'adhésion cellulaire en surface du PET, nous proposons d'y greffer des peptides RGD.

Pour comprendre au mieux les interactions cellules-matériaux, deux stratégies de fonctionnalisation ont été développées :

- la première consiste à greffer des peptides RGD avec des densités variées et contrôlées en surface du PET afin de déterminer la densité peptidique « idéale » nécessaire en surface d'un biomatériau pour favoriser l'attachement cellulaire,
- La deuxième consiste à réaliser des microdomaines de peptides RGD par le biais de deux techniques différentes afin d'évaluer l'impact de la répartition des molécules adhésives sur l'attachement cellulaire.

↳ Concernant les matériaux à densités de RGD contrôlées

La surface du PET a été modifiée par différents traitements chimiques avant d'être fonctionnalisée par le greffage covalent de peptides RGD. Brièvement, les différents traitements consistaient en la fixation de peptides RGD sur les groupements $-COOH$ du (i) PET vierge (densité 1), (ii) PET oxydé (densité 2), (iii) PET hydrolysé puis oxydé (densité 3) et (iv) PET irradié aux UV puis oxydé (densité 4). L'une des originalités de ce travail réside dans le mode d'immobilisation employée. Une chimie de fixation des molécules favorisant une stabilité à long terme est incontestablement la voie à suivre pour la réalisation d'implants biomédicaux. Le greffage de peptides RGD possède alors de nombreux avantages par rapport à une simple adsorption de molécules sur le matériau. Comme cela l'a été démontré, les avantages d'une fixation forte molécules/matériaux sont notamment un taux de désorption et d'échange pratiquement nul, un meilleur contrôle de l'homogénéité et de la reproductibilité de l'état de surface ainsi que la possibilité de maîtriser la densité de biomolécules immobilisées.

Toutes les étapes de modification ont été validées par différents outils de caractérisation physico-chimiques tels que la spectroscopie à photoélectrons X, la microscopie à force atomique ou la mesure des angles de contact.

L'imagerie β haute résolution a permis de mettre en évidence, non seulement un greffage relativement homogène des peptides en surface du PET, mais aussi la stabilité de ce greffage après plusieurs jours passés dans un environnement aqueux sous agitation susceptible d'induire la rupture des liaisons engagées. Suivant les traitements chimiques apportés, les densités surfaciques de molécules de lysine immobilisées sur le PET varient entre 0,6 et 2,4 pmol/mm², ce qui, d'après la littérature, semble suffisant pour promouvoir l'adhésion cellulaire et la formation des contacts focaux. Cependant, lors de l'analyse par imagerie β haute résolution, les peptides RGD ont été substitués par de la ³H-Lysine afin de permettre une quantification. Or, la réactivité et l'encombrement stérique de la lysine sont différents de ceux du peptide, il est donc difficile de transposer ces résultats. Il sera intéressant d'utiliser un peptide RGDC radiomarqué afin de quantifier la densité peptidique réellement greffée en surface du PET.

Des cellules de souris de type ostéoblaste (MC3T3) ont été mises en culture à la surface des différents matériaux obtenus afin d'évaluer leurs propriétés biomimétiques comparativement au PET non modifié. Un test colorimétrique a permis de quantifier le nombre de cellules adhérentes et un immunomarquage de l'actine et de la vinculine a permis d'observer la formation des contacts focaux. Les résultats obtenus par ces différentes techniques indiquent que le matériau présentant une densité peptidique de 0,6 pmol/mm² ne semble pas avoir d'impact sur l'adhésion des MC3T3 et n'induit pas la formation de contacts focaux contrairement aux matériaux ayant une densité de peptide supérieure ou égale à 1 pmol/mm². En effet, à partir d'une densité surfacique de 1 pmol/mm², des différences ont pu être observées entre les matériaux au niveau de l'adhésion des cellules MC3T3. Ces résultats montrent que plus la densité de peptides immobilisés en surface du PET est importante et plus la quantité de cellules adhérentes ainsi que le nombre de contacts focaux sont importants. Ces résultats seront complétés par une étude de l'évaluation de la force d'adhésion des cellules en fonction de la densité de peptides greffée en surface du PET. Il serait par exemple intéressant de mesurer la force d'adhésion des cellules dans une chambre de flux en envoyant des liquides avec un débit croissant en comptant, sur un champ fixe, le nombre de cellules qui restent attachées.

Il serait également intéressant d'élaborer des matériaux présentant des densités de RGD comprises entre 0,6 et 1pmol/mm² afin de déterminer la densité de peptides critique à partir de laquelle il n'y a plus d'influence sur l'adhésion des MC3T3.

Dans cette étude, nous avons choisi de travailler sur une biomolécule modèle, le peptide RGDC. Cependant, il est connu que cette séquence peptidique n'influence que peu l'adhésion des cellules. Ce travail pourra donc être approfondi par le greffage de différents peptides linéaires (GRGDSPC), cycliques (cyclo-(DfKRG)) ou des mimes peptidiques.

Ce travail a permis de comparer l'adhésion des MC3T3 sur des surfaces de PET présentant 4 densités différentes de peptides RGD. Cependant, tous les matériaux ont été élaborés par des traitements chimiques différents et les études physico-chimiques ont démontré de nombreuses modifications des propriétés physico-chimiques (caractère hydrophile) et morphologiques (rugosité) du matériau. Or, ces caractéristiques sont connues pour influencer l'adhésion des cellules. Une perspective directe serait donc de sélectionner un seul traitement chimique, par exemple le PET oxydé, et de faire varier la densité de peptides sur cette surface. Les matériaux présenteraient alors des différences de propriétés physico-chimiques et morphologiques moindres et cela permettrait alors d'isoler le paramètre « densité de peptides » lors de l'évaluation biologique.

Par ailleurs, le PET est un matériau couramment utilisé en chirurgie vasculaire. Des études sont donc actuellement en cours concernant l'influence de la densité de peptides RGD sur l'attachement de cellules endothéliales humaines issues de la veine saphène.

↳ Concernant les matériaux à distributions de RGD contrôlées

Notre intérêt s'est également porté sur la microdistribution des peptides RGD en surface de PET. En effet, l'importance de la distribution des ligands à une échelle micro- voire nanométrique a d'ores et déjà été démontrée.

Pour obtenir de telles surfaces nous avons utilisé deux méthodes différentes : la photoablation par laser UV à excimères et la photolithographie. Ces deux techniques ont permis d'élaborer de nombreux motifs présentant des tailles et des formes variables. La profilométrie optique et la microscopie électronique à balayage ont été utilisées pour valider l'obtention des motifs attendus théoriquement. Pour l'ablation laser, la distance focale et le nombre d'impulsions laser ont été des paramètres déterminants. En ce qui concerne la photolithographie, ces outils ont permis de vérifier que l'irradiation et l'enlèvement de la

photorésine s'effectuaient correctement. Dans les deux cas, l'imagerie β haute résolution a permis de valider le greffage des peptides RGD en microdomaines à la surface du PET ainsi que d'évaluer leur densité à 1,7 pmol/mm².

De la même manière que pour les matériaux à densités de peptides RGD variables, l'évaluation des propriétés biomimétiques des surfaces de PET microstructurées a été effectuée. L'observation des MC3T3 par microscopie électronique à balayage et par microscope à fluorescence, après le marquage des protéines impliquées dans la formation des plaques focales d'adhésion, a montré un alignement des cellules dans les zones contenant les peptides RGD, et ce, quelque soit la taille du domaine et quelque soit la technique de microstructuration utilisée.

Cependant des différences ont pu être observées en fonction de la taille des domaines. En effet, plus les zones contenant les peptides RGD sont petites (<50 μ m) et plus les cellules sont orientées, leur étalement s'en trouve donc fortement diminué. En revanche lorsque les domaines ont une taille d'environ 100 μ m, les cellules restent alignées mais présentent quand même un étalement et sont capables de se lier les unes entre les autres par l'extension de leurs pseudopodes.

Ces résultats semblent indiquer que les cellules sont sensibles à la microdistribution des ligands à la surface des matériaux. Cependant, des analyses de biologie moléculaire devront être effectuées afin d'étudier plus précisément l'impact de la taille des domaines sur les voies de signalisation cellulaire. De tels matériaux microstructurés pourraient être utilisés comme implants afin de permettre une colonisation cellulaire sélective à leur surface. Il serait donc intéressant, dans le cadre d'implant osseux, de vérifier si la minéralisation des cellules ostéoblastiques dépend de la microdistribution des peptides RGD à la surface des biomatériaux.

Dans cette étude, nous avons uniquement étudié la microdistribution des peptides RGD en surface du PET. Néanmoins la technique de photoablation a été choisie car elle permet de descendre à des tailles de domaines inférieures au micron. Il serait donc intéressant d'utiliser l'ablation au laser à excimères pour réaliser des domaines nano-métriques et étudier l'influence de la nano-distribution de peptides RGD sur l'adhésion cellulaire. Néanmoins, d'autres techniques telles que l'impression par micro-contact ou le MAPLE-DW pourraient également être utilisées pour obtenir des matériaux nano-structurés (Chapitre IV : Micro- et nano-distribution de biomolécules en surface de matériaux »).

La principale perspective concernant la réalisation de domaines par photolithographie est la possibilité d'obtenir des surfaces bi-fonctionnalisées. Un même matériau pourrait en effet présenter à sa surface à la fois des peptides YIGSR, spécifiques des cellules endothéliales, et des peptides spécifiques des cellules ostéoblastiques, dans le but d'étudier les phénomènes liés à la coopération ostéoendothéliale.

En conclusion, les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence l'influence de la densité et de la microdistribution des peptides RGD greffés en surface de PET sur l'adhésion et l'étalement de cellules pré-ostéoblastiques de souris. Une meilleure compréhension du comportement cellulaire sur des surfaces de PET ainsi modifiées a pu permettre la réalisation d'un nouveau matériau hybride modèle associant le PET et les cellules MC3T3. Les résultats obtenus *in vitro* sont très encourageants mais devront toutefois être validés par des études *in vivo* afin de conclure de façon définitive sur la bioactivité de ces matériaux.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Exemples d'implants métalliques utilisés en chirurgie : (a) Prothèse totale de hanche, (b) prothèse totale de genou, (c) vis fémorales, (d) valve cardiaque, (e) prothèse endovasculaire, (f) stimulateur cardiaque. ----- 18
- Figure 2. Formule chimique du Polyéthylène téréphtalate ----- 25
- Figure 3. Synthèse du Polyéthylène téréphtalate par polycondensation d'acide téréphtalique et d'éthylène glycol. ----- 25
- Figure 4. Représentation schématique de la formation du clou plaquettaire et adsorption de protéines à la surface d'un implant vasculaire (D'après (Hersel *et al.*, 2003)). -- 28
- Figure 5. Illustration de la réaction de l'organisme lors de l'implantation d'un corps étrangers. ----- 29
- Figure 6. La séquence RGD ----- 48
- Figure 7. Représentation schématique d'une intégrine. La liaison du ligand contenant la séquence RGD à la surface de la cellule est réalisée par l'intermédiaire des récepteurs de l'adhésion cellulaire (les intégrines). Les intégrines sont des hétérodimères constitués de deux sous unités α et β liées de manière non covalente (D'après (Horton, 1997)). ----- 49
- Figure 8. Les intégrines, composés de deux sous-unités α et β , jouent un rôle important dans l'attachement cellulaire en formant une liaison entre les protéines de la matrice extra cellulaire (MEC) d'une part, et les éléments du cytosquelette de la cellule d'autr part. Les intégrines lient les domaines d'adhésion des protéines de la MEC par reconnaissances spécifiques de ces sites. La séquence RGD, présente dans la fibronectine et dans beaucoup d'autres protéines d'adhésion cellulaire, est l'unité fonctionnelle minimale permettant la conservation de l'activité d'attachement des cellules. ----- 52
- Figure 9. Les voies de signalisation de l'adhésion focale
 Le schéma simplifié propose un résumé des possibilités d'interaction entre les protéines du complexe d'adhésion et les voies de signalisation sous-jacentes. FAK est initialement activée par l'intermédiaire d'intégrines et/ou de facteurs de croissance. Cette activation va permettre la liaison et l'activation de plusieurs protéines. (1) Graf, Grb7, PLC- γ . vont participer au remaniement du cytosquelette d'actine, engendrant ainsi un cycle de migration et d'adhérence cellulaires avec pour chaque étape une restructuration et une déstructuration des complexes d'adhérence. p130^{Cas}, Grb2, PI3-kinase vont secondairement participer à l'activation en cascade de plusieurs voies intracellulaires, la voie de ERK (2 et 3), la voie de JNK (4) et la voie de la PI3-kinase (5). Elles vont permettre *in fine* de régler plusieurs processus vitaux pour la cellule telles que la

	survie, la prolifération et la migration cellulaires en favorisant l'activation de facteurs de transcription.-----	54
Figure 10.	Schématisation de l'adhésion cellulaire en surface de matériaux fonctionnalisés par des peptides RGD. -----	55
Figure 11.	Modification de la surface du PET par voie chimique -----	62
Figure 12.	Réaction de Norrish I -----	65
Figure 13.	Réaction de Norrish II -----	65
Figure 14.	Coefficient d'absorption du PET en fonction de la longueur d'onde -----	65
Figure 15.	Réaction de couplage par le N-terminal d'un peptide RGD protégé sur les groupements carboxyles de surface puis clivage des groupes de protection.-----	67
Figure 16.	Les peptides RGD par le biais de leur fonction N-terminale réagissent avec les différents groupements présents en surface du matériau : (A) groupements carboxyliques préactivés avec un carbodiimide et NHS pour générer un ester actif, (B) groupements amines préactivés avec DSC (N,N'-disuccinimidyl carbonate), (C) groupements hydroxyles préactivés pour former des trésylates, (D) groupements hydroxyles préactivés pour former du p-nitrophényl carbonate -----	68
Figure 17.	Couplage chimique sélectif entre deux fonctions antagonistes. (A) réaction entre une fonction thiol et une fonction bromoacétyle du peptide, (B) réaction entre une fonction aldéhyde et une fonction aminoxy du peptide, (C) réaction entre une fonction acrylate et une fonction thiol du peptide, (D) réaction entre une fonction maléimide et une fonction thiol du peptide -----	69
Figure 18.	Représentation schématique du réacteur servant à la copolymérisation de l'acide acrylique et du RGD-acide acrylique -----	70
Figure 19.	Réaction de la ninhydrine sur un acide aminé-----	72
Figure 20.	Schéma réactionnel du réactif d'Ellman (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoate)) sur la cystéine -----	73
Figure 21.	Principe de fonctionnement du μ -imager -----	75
Figure 22.	Illustration schématique de polymères étoiles présentant des ligands RGD pour l'adhésion cellulaire. -----	78
Figure 23.	Le procédé de photolithographie -----	83
Figure 24.	Schéma de principe de l'impression par microcontact -----	87
Figure 25.	Principe du MAPLE-DW-----	89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Composition massique des alliages utilisés comme implants chirurgicaux-----	19
Tableau 2.	Comparatif des principales propriétés mécaniques des alliages métalliques chirurgicaux et de l'os cortical-----	20
Tableau 3.	Principales céramiques utilisées pour les applications médicales -----	21
Tableau 4.	Principales propriétés mécaniques des biomatériaux céramique -----	21
Tableau 5.	Applications biomédicales de quelques polymères -----	23
Tableau 6.	Principales propriétés mécaniques de biomatériaux polymères-----	24
Tableau 7.	Séquences de liaison des protéines de la matrice extracellulaire aux intégrines -	50
Tableau 8.	Caractéristiques des différents types d'adhésion cellulaire-----	52

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

↳ PUBLICATIONS

C. Chollet, S. Lazare, B. Brouillaud, C. Labrugère, R. Bareille et M.C. Durrieu

“RGD Peptides Grafting onto micro-patterned PET: Peptide distribution impact on cell attachment”

Journal of Laser micro/nano engineering. 2006, 1, 226-230.

C. Chollet, C. Chanseau, B. Brouillaud, et M.C. Durrieu

“RGD Peptides Grafting onto Poly (ethylene terephthalate) with well controlled densities”

Biomolecular Engineering. Sous presse

C. Chollet, S. Lazare, C. Labrugère, F. Guillemot, R. Bareille et M.C. Durrieu

“Micro-RGD patterning of Poly (ethylene terephthalate) surfaces”

ITBM-RBM. 2007 ; 28 (1) : 2-12.

C. Chollet, C. Labrugère, C. Chanseau, A. Guignandon et M.C. Durrieu

“RGD peptides grafting onto Poly (ethylene terephthalate) with well controlled densities: Physico-chemical and biological characterization”

Biomaterials. Soumis

C. Chollet, F. Guillemot, S. Lazare, C. Labrugère et M.C. Durrieu

“RGD peptides grafted onto micro-patterned Poly(ethylene terephthalate): influence of peptide distribution on osteoblast cells attachment”

Biomaterials. Soumis

☞ COMMUNICATIONS ORALES

C. Chollet, S. Lazare, B. Brouillaud, C. Chanseau, M.C. Durrieu

“RGD Peptide Grafting onto micro-patterned Poly(ethylene terephthalate)”

EMRS fall meeting 2006, Varsovie

C. Chollet, S. Lazare, R. Bareille, C. Labrugère, F. Guillemot, M.C. Durrieu

“RGD Peptide Grafting onto PET: Impact of density and spatial distribution on cell attachment”

ESB 2006, Nantes

C. Chollet, S. Lazare, C. Chanseau, B. Brouillaud, R. Bareille, M.C. Durrieu

“Greffage de peptides RGDC à la surface de Polyéthylène téréphthalate) : création de microdomaines”

Matériaux 2006, Dijon

C. Chollet, S. Lazare, F. Guillemot, M.C. Durrieu

“UV excimer laser ablation of RGD peptide grafted onto PET: Impact on cell attachment”

LPM 2007, Vienne

C. Chollet, S. Lazare, F. Guillemot, P.L. Granja, M.C. Durrieu

“UV excimer laser ablation of RGD peptides grafted onto Poly(ethylene terephthalate): impact on cell attachment”

ESB 2007, Brighton

C. Chollet, C. Labrugère, F. Guillemot, M.C. Durrieu

“Impact of RGD peptide density grafted onto Poly(ethylene terephthalate) on MC3T3 cell attachment”

IEEE 2007, Lyon

N. Chigarev, C. Rossignol, B. Audoin, G. Forget, F. Guillemot, C. Chollet, M.C. Durrieu

“Picosecond ultrasonics on mesoscopic scale: application to the study of biological cells”

Phonons 2007, Paris

S. Lazare, R. Bonneau, A. Sionkowska, M. Wiśniewski, J. Lopez, M-C.Hernandez, C.Chollet, F. Guillemot, M-C. Durrieu, S. Gaspard, M. Oujja , R. de Nalda, M. Castillejo, C. Abrusci, F. Catalina et L. Bañares

“Laser produced biomimetic nanofoams for artificial extracellular matrices: what is the situation?”

COLA 2007, Espagne

↳ COMMUNICATION AFFICHEES

C. Chollet, M. Remy-Zolghadri, R. Bareille, C. Labrugère, S. Lazare, M.C. Durrieu

“RGD Peptide Grafting onto micro-patterned PET: Peptide distribution impact on cell attachment”

ESB 2005, Sorrento

C. Chollet, S. Lazare, B. Brouillaud, C. Labrugere, R. Bareille, M.C. Durrieu

“RGD Peptide Grafting onto micro-patterned PET: Peptide distribution impact on osteoblast cells attachment”

LAMP 2006, Kyoto

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABSOLOM D.R., ZINGG W. and NEUMANN A.W. Protein adsorption to polymer particles: role of surface properties. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1987 Feb;21(2):161-71.

ALTANKOV G., RICHAU K. and GROTH T. The role of surface zeta potential and substratum chemistry for regulation of dermal fibroblasts interaction. *Material wissenschaft und Werkstofftechnik*. 2003;34(12):1120-1128.

ALTANKOV G., THOM V., GROTH T., JANKOVA K., JONSSON G. and ULBRICHT M. Modulating the biocompatibility of polymer surfaces with poly(ethylene glycol): Effect of fibronectin. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;52(1):219-230.

ANSELME K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000 Apr;21(7):667-81.

ARIMA Y. and IWATA H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 2007;28(20):3074-3082.

AUGER F. Le génie tissulaire: du rêve à la réalité. *Médecine/sciences*. 2000;16:1324-31.

AUGER F.A., BERTHOD F., MOULIN V., POULIOT R. and GERMAIN L. Tissue-engineered skin substitutes: from *in vitro* constructs to in vivo applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2004 Jun;39(Pt 3):263-75.

BANERJEE P., IRVINE D.J., MAYES A.M. and GRIFFITH L.G. Polymer latexes for cell-resistant and cell-interactive surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;50(3):331-339.

BANNASCH H., MOMENI A., KNAM F., STARK G.B. and FOHN M. Tissue engineering of skin substitutes. *Panminerva Medica*. 2005 Mar;47(1):53-60.

BARBOSA J.N., BARBOSA M.A. and AGUAS A.P. Inflammatory responses and cell adhesion to self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Biomaterials*. 2004;25(13):2557-2563.

BARRON J.A., RINGEISEN B.R., KIM H., SPARGO B.J. and CHRISEY D.B. Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films*. 2004;453-454:383-387.

BARTHE N., CHATTI K., COULON P., MAITREJEAN S. and BASSE-CATHALINAT B. Recent technologic developments on high-resolution beta imaging systems for quantitative autoradiography and double labeling applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. 2004 2004/7/11;527(1-2):41-45.

BARTHE N., COULON P., HENNION C., DUCASSOU D., BASSE-CATHALINAT B. and CHARPAK G. Optimization of a new scintillation gas detector used to localize electrons emitted by Tc. *Journal of Nuclear Medicine*. 1999;40(5):868-875.

BARTOUILH DE TAILLAC L., PORTE-DURRIEU M.C., LABRUGERE C., BAREILLE R., AMEDEE J. and BAQUEY C. Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation. *Composites Science and Technology*. 2004 2004/5;64(6):827-837.

BAUDRILLER H., CHABRAND P. and MOUKOKO D. Modeling UHMWPE wear debris generation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007;80B(2):479-485.

BEER J.H., SPRINGER K.T. and COLLER B.S. Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood*. 1992 January 1, 1992;79(1):117-128.

BERNARD A., DELAMARCHE E., SCHMID H., MICHEL B., BOSSHARD H.R. and BIEBUYCK H. Printing Patterns of Proteins. *Langmuir*. 1998;14(9):2225-2229.

BIGERELLE M., ANSELME K., NOEL B., RUDERMAN I., HARDOUIN P. and IOST A. Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase *in vitro* human osteoblast response. *Biomaterials*. 2002 Apr;23(7):1563-77.

BILTRESSE S., ATTOLINI M., DIVE G., CORDI A., TUCKER G.C. and MARCHAND-BRYNAERT J. Novel RGD-like molecules based on the tyrosine template: design, synthesis, and biological evaluation on isolated integrins $\alpha V\beta 3/\alpha II\beta 3$ and in cellular adhesion tests. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004 Oct 15;12(20):5379-93.

BILTRESSE S., ATTOLINI M. and MARCHAND-BRYNAERT J. Cell adhesive PET membranes by surface grafting of RGD peptidomimetics. *Biomaterials*. 2005;26(22):4576-4587.

BISSON I., KOSINSKI M., RUAULT S., GUPTA B., HILBORN J., WURM F. and FREY P. Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethylene terephthalate) surfaces for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2002;23(15):3149-3158.

BORDENAVE L., FERNANDEZ P., REMY-ZOLGHADRI M., VILLARS S., DACULSI R. and MIDY D. *In vitro* endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2005;33(3):227-34.

BOUTIN P. Total arthroplasty of the hip by fritted aluminum prosthesis. Experimental study and 1st clinical applications. *Arthroplastie totale de la hanche par prothese en alumine frittee. Etude experimentale et premieres applications cliniques*. 1972;58(3):229-246.

BOUTIN P., CHRISTEL P., DORLOT J.M., MEUNIER A., ROQUANCOURT A.D., BLANQUAERT D., HERMAN S., SEDEL L. and WITVOET J. The use of dense alumina-alumina ceramic combination in total hip replacement. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1988;22(12):1203-1232.

BOXUS M.-B. Chemical essays of End-groups Displayed on the surface of PET films and membranes by radiolabelling. *Polymer for advanced Technologies*. 1996;0:589-598.

- BOXUS T., TOUILLAUX R., DIVE G. and MARCHAND-BRYNAERT J. Synthesis and evaluation of RGD peptidomimetics aimed at surface bioderivatization of polymer substrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1998;6(9):1577-1595.
- BOYD K.L., SCHMIDT S., PIPPERT T.R., HITE S.A. and SHARP W.V. The effects of pore size and endothelial cell seeding upon the performance of small-diameter e-PTFE vascular grafts under controlled flow conditions. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1988;22(3):163-177.
- BRANDLEY B.K. and SCHNAAR R.L. Tumor cell haptotaxis on covalently immobilized linear and exponential gradients of a cell adhesion peptide. *Developmental Biology*. 1989;135(1):74-86.
- BRAYE F., HAUTIER A., BOUEZ C. and DAMOUR O. Les substituts cutanes reconstruits en laboratoire : application au traitement des brulés. *Pathologie Biologie*. 2005;53(10):613-617.
- BRITLAND S., PERRIDGE C., DENYER M., MORGAN H., CURTIS A. and WILKINSON C. Morphogenetic guidance cues can interact synergistically and hierarchically in steering nerve cell growth. *Experimental Biology Online*. 1997;1(2):1-15.
- BROCKETT C., WILLIAMS S., JIN Z., ISAAC G. and FISHER J. Friction of total hip replacements with different bearings and loading conditions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2006;9999(9999):NA.
- BRUDER S.P., KRAUS K.H., GOLDBERG V.M. and KADIYALA S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998 Jul;80(7):985-96.
- BRUNSKI J.B. Metals. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; 1996. p. 37-50.
- CALAFIORE R., BASTA G., LUCA G., LEMMI A., MONTANUCCI M.P., CALABRESE G., RACANICCHI L., MANCUSO F. and BRUNETTI P. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care*. 2006 Jan;29(1):137-8.
- CANCEDDA R., DOZIN B., GIANNONI P. and QUARTO R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*. 2003 Mar;22(1):81-91.
- CASTNER D.G. and RATNER B.D. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science*. 2002 2002/3/10;500(1-3):28-60.
- CAVALCANTI-ADAM E.A., VOLBERG T., MICOULET A., KESSLER H., GEIGER B. and SPATZ J. Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics are Regulated by Spacing of Integrin Ligands. *Biophysics Journal*. 2007 Feb 2.
- CHAKFE N., DIEVAL F., THAVEAU F., RINCKENBACH S., HASSANI O., CAMELOT G., DURAND B. and KRETZ J.G. Substituts vasculaires. *Annales de Chirurgie*. 2004;129(5):301-309.

CHAREST J.L., GARCIA A.J. and KING W.P. Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries. *Biomaterials*. 2007 Apr;28(13):2202-10.

CHEHROUDI B., GOULD T.R. and BRUNETTE D.M. Effects of a grooved epoxy substratum on epithelial cell behavior *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1988;22(6):459-473.

CHEN C.S., MRKSICH M., HUANG S., WHITESIDES G.M. and INGBER D.E. Micropatterned Surfaces for Control of Cell Shape, Position, and Function. *Biotechnology Progress*. 1998;14(3):356-363.

CHOQUET D., FELSENFELD D.P. and SHEETZ M.P. Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin-Cytoskeleton Linkages. *Cell*. 1997;88(1):39-48.

CHUNG T.-W., LIU D.-Z., WANG S.-Y. and WANG S.-S. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials*. 2003;24(25):4655-4661.

CLARK P., CONNOLLY P., CURTIS A.S., DOW J.A. and WILKINSON C.D. Cell guidance by ultrafine topography *in vitro*. *Journal of Cell Science*. 1991 May 1, 1991;99(1):73-77.

CLARK P., CONNOLLY P., CURTIS A.S., DOW J.A. and WILKINSON C.D. Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata. *Development*. 1990 April 1, 1990;108(4):635-644.

COREY J.M., WHEELER B.C. and BREWER G.J. Compliance of hippocampal neurons to patterned substrate networks. *Journal of Neuroscience Research*. 1991;30(2):300-307.

CORNILLON J., CAMPOS L. and GUYOTAT D. Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. *Medecine/Sciences*. 2003;19:743-752.

CORNISH T., BRANCH D.W., WHEELER B.C. and CAMPANELLI J.T. Microcontact Printing: A Versatile Technique for the Study of Synaptogenic Molecules. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2002;20(1):140-153.

CRAIG W.S., CHENG S., MULLEN D.G., BLEVITT J. and PIERSCHBACHER M.D. Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals. *Biopolymers*. 1995;37(2):157-175.

CRUMEYROLLE-ARIAS M., JAFARIAN-TEHRANI M., CARDONA A., EDELMAN L., ROUX P., LANIECE P., CHARON Y. and HAOUR F. Radioimagers as an alternative to film autoradiography for *in situ* quantitative analysis of I-ligand receptor binding and pharmacological studies. *Histochemical Journal*. 1996;28(11):801-809.

CSUCS G., MICHEL R., LUSSI J.W., TEXTOR M. and DANUSER G. Microcontact printing of novel co-polymers in combination with proteins for cell-biological applications. *Biomaterials*. 2003;24(10):1713-1720.

CUKIERMAN E., PANKOV R., STEVENS D.R. and YAMADA K.M. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*. 2001 November 23, 2001;294(5547):1708-1712.

CURTIS A. and WILKINSON C. Topographical control of cells. *Biomaterials*. 1997 Dec;18(24):1573-83.

CURTIS A.S. Small is beautiful but smaller is the aim: review of a life of research. *European Cells & Materials Journal*. 2004;8:27-36.

DAI W., BELT J. and SALTZMAN W.M. Cell-binding Peptides Conjugated to Poly(ethylene glycol) Promote Neural Cell Aggregation. *Nat Biotech*. 1994;12(8):797-801.

DAY M. and WILES D.M. Photochemical degradation of poly(ethylene terephthalate). III. Determination of decomposition products and reaction mechanism. *Journal of Applied Polymer Science*. 1972;16(1):203-215.

DEE K.C., PULEO D.A. and BIZIOS R. *Biomaterials. An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions*; 2003. p. 1-13.

DEGASNE I., BASLÉ M.F., DEMAIS V., HURÉ G., LESOURD M., GROLLEAU B., MERCIER L. and CHAPPARD D. Effects of Roughness, Fibronectin and Vitronectin on Attachment, Spreading, and Proliferation of Human Osteoblast-Like Cells (Saos-2) on Titanium Surfaces. *Calcified Tissue International*. 1999;64(6):499-507.

DELFORGE D., GILLON B., ART M., DEWELLE J., RAES M. and REMACLE J. Design of a synthetic adhesion protein by grafting RGD tailed cyclic peptides on bovine serum albumin. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 1998;5(2):87-91.

DETTIN M., TERESA M., ROBERTA C., ANTONELLA G., MARCELLA P., DI BELLO F.C. and PARNIGOTTO P.P. Novel osteoblast-adhesive peptides for dental/orthopedic biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;60(3):466-471.

DEUTSCH M., MEINHART J., FISCHLEIN T., PREISS P. and ZILLA P. Clinical autologous *in vitro* endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery*. 1999 Nov;126(5):847-55.

DEUTSCH M., MEINHART J., VESELY M., FISCHLEIN T., GROSCURTH P., VON OPPELL U. and ZILLA P. *In vitro* endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene grafts: a clinical case report after 41 months of implantation. *Journal of Vascular Surgery*. 1997 Apr;25(4):757-63.

DOUVILLE E.C., KEMPCZINSKI R.F., BIRINYI L.K. and RAMALANJAONA G.R. Impact of endothelial cell seeding on long-term patency and subendothelial proliferation in a small-caliber highly porous polytetrafluoroethylene graft. *Journal of Vascular Surgery*. 1987 Apr;5(4):544-50.

DRUMHELLER P.D. and HUBBELL J.A. Polymer Networks with Grafted Cell Adhesion Peptides for Highly Biospecific Cell Adhesive Substrates. *Analytical Biochemistry*. 1994;222(2):380-388.

DUFRANE D., GOEBBELS R.M., SALIEZ A., GUIOT Y. and GIANELLO P. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. *Transplantation*. 2006 May 15;81(9):1345-53.

DUMBLETON J.H., D'ANTONIO J.A., MANLEY M.T., CAPELLO W.N. and WANG A. The basis for a second-generation highly cross-linked UHMWPE. *Clin Orthop Relat Res.* 2006 Dec;453:265-71.

DUNCAN A.C., ROUAIS F., LAZARE S., BORDENAVE L. and BAQUEY C. Effect of laser modified surface microtopochemistry on endothelial cell growth. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2007;54(2):150-159.

DURRIEU M.C., PALLU S., GUILLEMOT F., BAREILLE R. and AMEDÉE J. Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *Journal of materials science: materials in medicine.* 2004;15:779-786.

EHTESHAMI G., BRUNE D.C., LOPEZ J.C. and MASSIA S.P. A bioconjugate of Lys and Arg mimics biological activity of the Arg-Gly-Asp peptide sequence. *Acta Biomater.* 2005 Jan;1(1):85-91.

ELBERT D.L. and HUBBELL J.A. Conjugate Addition Reactions Combined with Free-Radical Cross-Linking for the Design of Materials for Tissue Engineering. *Biomacromolecules.* 2001;2(2):430-441.

ELLIOTT R.B., ESCOBAR L., TAN P.L., GARKAVENKO O., CALAFIORE R., BASTA P., VASCONCELLOS A.V., EMERICH D.F., THANOS C. and BAMBRA C. Intraperitoneal alginate-encapsulated neonatal porcine islets in a placebo-controlled study with 16 diabetic cynomolgus primates. *Transplant Proc.* 2005 Oct;37(8):3505-8.

FALCONNET D., CSUCS G., MICHELLE GRANDIN H. and TEXTOR M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials.* 2006;27(16):3044-3063.

FAUCHEUX N., SCHWEISS R., LUTZOW K., WERNER C. and GROTH T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials.* 2004;25(14):2721-2730.

FAUCHEUX N., TZONEVA R., NAGEL M.-D. and GROTH T. The dependence of fibrillar adhesions in human fibroblasts on substratum chemistry. *Biomaterials.* 2006;27(2):234-245.

FAUST V., HEIDENAU F., SCHMIDGALL J., STENZEL F., LIPPS G. and ZIEGLER G. Biofunctionalised biocompatible titania coatings for implants. *Key Engineering Materials.* 2001 9 September 2001 through 13 September 2001;206-213(III):1547-1550.

FECHINE G.J.M., RABELLO M.S., SOUTO MAIOR R.M. and CATALANI L.H. Surface characterization of photodegraded poly(ethylene terephthalate). The effect of ultraviolet absorbers. *Polymer.* 2004;45(7):2303-2308.

FIELDS G.B., LAUER J.L., DORI Y., FORNS P., YU Y.G. and TIRRELL M. Proteinlike molecular architecture: Biomaterial applications for inducing cellular receptor binding and signal transduction. *Peptide Science.* 1998;47(2):143-151.

FISCHER-COLBRIE G., HEUMANN S., LIEBMINGER S., ALMANSA E., CAVACO-PAULO A. and GUEBITZ G.M. New enzymes with potential for PET surface modification. *Biocatalysis and Biotransformation.* 2004;22(5):341 - 346.

FRANCK HUBERT G.D.G.T. Equilibria in the alcoholysis reactions of terephthalic esters and chemical valorization of polyethyleneterephthalate waste. I. Equilibrium constants determination. Journal of Applied Polymer Science. 1999;72(3):329-340.

FRIEDENSTEIN A.J., PIATETZKY S., II and PETRAKOVA K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol. 1966 Dec;16(3):381-90.

FU T., ZHANG Y., LI H. and XU K. [*In vitro* dissolution study on the hydroxyapatite biocoatings]. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2000 Dec;17(4):373-5.

FUJIMOTO K., MINATO M., MIYAMOTO S., KANEKO T., KIKUCHI H., SAKAI K., OKADA M. and IKADA Y. Porous polyurethane tubes as vascular graft. Journal of Applied Biomaterials. 1993;4(4):347-354.

GARLAND W. FUSSELL S.L.C. Endothelial cell adhesion on RGD-containing methacrylate terpolymers. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2004 2 jun 2004;70A(2):265-273.

GARLAND W.F. and COOPER S.L. Endothelial cell adhesion on RGD-containing methacrylate terpolymers. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2004 2 jun 2004;70A(2):265-273.

GAUTHIER O., MULLER R., VON STECHOW D., LAMY B., WEISS P., BOULER J.M., AGUADO E. and DACULSI G. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. Biomaterials. 2005 Sep;26(27):5444-53.

GE S., WANG Q., ZHANG D., ZHU H., XIONG D., HUANG C. and HUANG X. Friction and wear behavior of nitrogen ion implanted UHMWPE against ZrO₂ ceramic. Wear. 2003;255(7-12):1069-1075.

GEIGER B. CELL BIOLOGY: Encounters in Space. Science. 2001 November 23, 2001;294(5547):1661-1663.

GEIGER B. and BERSHADSKY A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. Current Opinion in Cell Biology. 2001;13(5):584-592.

GEIGER B., BERSHADSKY A., PANKOV R. and YAMADA K.M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Nov;2(11):793-805.

GERMAIN L., CARRIER P., AUGER F.A., SALESSE C. and GUERIN S.L. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? Prog Retin Eye Res. 2000 Sep;19(5):497-527.

GROTH T. and ALTANKOV G. Studies on cell-biomaterial interaction: role of tyrosine phosphorylation during fibroblast spreading on surfaces varying in wettability. Biomaterials. 1996;17(12):1227-1234.

GUBITZ G.M. and PAULO A.C. New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers. Current Opinion in Biotechnology. 2003;14(6):577-582.

GUILLEMOT F., BROUILLAUD B., LABRUGERE C., BARTHE N. and DURRIEU M.C. High resolution [beta]-imager: a new tool for characterizing 2D peptide distribution on biomimetic materials? ITBM-RBM. 2007;In Press, Corrected Proof.

HAMILTON D.W. and BRUNETTE D.M. The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. *Biomaterials*. 2007 Apr;28(10):1806-19.

HAN D.K., PARK K.D., RYU G.H., KIM U.Y., MIN B.G. and KIM Y.H. Plasma protein adsorption to sulfonated poly(ethylene oxide)-grafted polyurethane surface. *J Biomed Mater Res*. 1996 Jan;30(1):23-30.

HANAWA T. Evaluation techniques of metallic biomaterials *in vitro*. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2002;3(4):289-295.

HATANO K., INOUE H., KOJO T., MATSUNAGA T., TSUJISAWA T., UCHIYAMA C. and UCHIDA Y. Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. *Bone*. 1999;25(4):439-445.

HAYNES C.A. and NORDE W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1994;2(6):517-566.

HEAD W.C., BAUK D.J. and EMERSON R.H., JR. Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1995 Feb(311):85-90.

HENCH L.L. Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; 1996. p. 73-84.

HERRING M., SMITH J., DALRING M., GLOVER J., COMPTON R., ETCHBERGER K. and ZOLLINGER T. Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses: the failure of low-density seeding to improve patency. *Journal of Vascular Surgery*. 1994 Oct;20(4):650-5.

HERSEL U., DAHMEN C. and KESSLER H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003 2003/11;24(24):4385-4415.

HESS F., STEEGHS S., JERUSALEM R., REIJNDERS O., JERUSALEM C., BRAUN B. and GRANDE P. Patency and morphology of fibrous polyurethane vascular prostheses implanted in the femoral artery of dogs after seeding with subcultivated endothelial cells. *Eur Journal of Vascular Surgery*. 1993 Jul;7(4):402-8.

HEUMANN S., EBERL A., POBEHEIM H., LIEBMINGER S., FISCHER-COLBRIE G., ALMANSA E., CAVACO-PAULO A. and GUBITZ G.M. New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2006 Nov 30;69(1-2):89-99.

HEYDARKHAN-HAGVALL S., ESGUERRA M., HELENIUS G., SODERBERG R., JOHANSSON B.R. and RISBERG B. Production of extracellular matrix components in tissue-engineered blood vessels. *Tissue Eng*. 2006 Apr;12(4):831-42.

- HIRANO Y., OKUNO M., HAYASHI T., GOTO K. and NAKAJIMA A. Cell-attachment activities of surface immobilized oligopeptides RGD, RGDS, RGDV, RGDT, and YIGSR toward five cell lines. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. 1993;4(3):235-43.
- HO M.-H., WANG D.-M., HSIEH H.-J., LIU H.-C., HSIEN T.-Y., LAI J.-Y. and HOU L.-T. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26(16):3197-3206.
- HO W.F., JU C.P. and CHERN LIN J.H. Structure and properties of cast binary Ti-Mo alloys. *Biomaterials*. 1999;20(22):2115-2122.
- HORBETT T.A. and LEW K.R. Residence time effects on monoclonal antibody binding to adsorbed fibrinogen. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. 1994;6(1):15-33.
- HORCH R.E., KOPP J., KNESER U., BEIER J. and BACH A.D. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005 Jul-Sep;9(3):592-608.
- HORTON M.A. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1997 May;29(5):721-5.
- HOWE A.K., APLIN A.E. and JULIANO R.L. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. . 2002 Feb;12(1):30-5.
- HU K.K., DAI Y.C., LI J., LEI Y., YUAN J.D., LI J. and WU Q. [Construction of a tissue engineering skin with epidermal stem cells]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2007 Jan;23(1):25-8.
- HU X., LUI W., CUI L., WANG M. and CAO Y. Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma. *Tissue Engineering*. 2005 Nov-Dec;11(11-12):1710-7.
- HUBBELL J.A. Bioactive biomaterials. *Current Opinion Biotechnology*. 1999;10:123-129.
- HUBBELL J.A., MASSIA S.P., DESAI N.P. and DRUMHELLER P.D. Endothelial cell-selective materials for Tissue Engineering in the vascular graft via a new receptor. *Biotechnology*. 1991;9(6):568-572.
- HUDON V., BERTHOD F., BLACK A.F., DAMOUR O., GERMAIN L. and AUGER F.A. A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation *in vitro*. *British Journal of Dermatology*. 2003 Jun;148(6):1094-104.
- HYNES R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):11-25.
- HYUN J., ZHU Y., LIEBMANN-VINSON A., BEEBE T.P. and CHILKOTI A. Microstamping on an Activated Polymer Surface: Patterning Biotin and Streptavidin onto Common Polymeric Biomaterials. *Langmuir*. 2001;17(20):6358-6367.

INOUCHI H., KWON I.K., INOUE E., TAKAMIZAWA K., MAEHARA Y. and MATSUDA T. Mechanical responses of a compliant electrospun poly(l-lactide-co-[epsilon]-caprolactone) small-diameter vascular graft. *Biomaterials*. 2006;27(8):1470-1478.

IRVINE D.J., HUE K.-A., MAYES A.M. and GRIFFITH L.G. Simulations of cell-surface integrin binding to nanoscale-clustered adhesion ligands. *Biophysical Journal*. 2002;82(1):120-132.

IRVINE D.J., MAYES A.M. and GRIFFITH L.G. Nanoscale Clustering of RGD Peptides at Surfaces Using Comb Polymers. 1. Synthesis and Characterization of Comb Thin Films. *Biomacromolecules*. 2001;2(1):85-94.

ITO Y., KAJIHARA M. and IMANISHI Y. Materials for enhancing cell adhesion by immobilization of cell-adhesive peptide. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1991;25(11):1325-1337.

IVANOV B., GRZESIK W. and ROBEY F.A. Synthesis and Use of a New Bromoacetyl-Derivatized Heterotrifunctional Amino Acid for Conjugation of Cyclic RGD-Containing Peptides Derived from Human Bone Sialoprotein. *Bioconjugate Chemistry*. 1995;6(3):269-277.

JAMES C.D., DAVIS R.C., KAM L., CRAIGHEAD H.G., ISAACSON M., TURNER J.N. and SHAIN W. Patterned Protein Layers on Solid Substrates by Thin Stamp Microcontact Printing. *Langmuir*. 1998;14(4):741-744.

JANORKAR A.V., FRITZ E.W.J., BURG K.L.J., METTERS A.T. and HIRT D.E. Grafting amine-terminated branched architectures from poly(L-lactide) film surfaces for improved cell attachment. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007;81B(1):142-152.

JIANG X.-S., CHAI C., ZHANG Y., ZHUO R.-X., MAO H.-Q. and LEONG K.W. Surface-immobilization of adhesion peptides on substrate for ex vivo expansion of cryopreserved umbilical cord blood CD34+ cells. *Biomaterials*. 2006;27(13):2723-2732.

JO S., ENGEL P.S. and MIKOS A.G. Synthesis of poly(ethylene glycol)-tethered poly(propylene fumarate) and its modification with GRGD peptide. *Polymer*. 2000;41(21):7595-7604.

JO S., SHIN H. and MIKOS A.G. Modification of Oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) Macromer with a GRGD Peptide for the Preparation of Functionalized Polymer Networks. *Biomacromolecules*. 2001;2(1):255-261.

KAKABAKOS S.E., TYLLIANAKIS P.E., EVANGELATOS G.P. and ITHAKISSIOS D.S. Colorimetric determination of reactive solid-supported primary and secondary amino groups. *Biomaterials*. 1994;15(4):289-297.

KALITA S.J., BHARDWAJ A. and BHATT H.A. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27(3):441-449.

KAM L. and BOXER S.G. Cell adhesion to protein-micropatterned-supported lipid bilayer membranes. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;55(4):487-495.

KANG C.E., GEMEINHART E.J. and GEMEINHART R.A. Cellular alignment by grafted adhesion peptide surface density gradients. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004;71A(3):403-411.

KANTLEHNER M., FINSINGER D., MEYER J., SCHAFFNER P., JONCZYK A., DIEFENBACH B., NIES B. and KESSLER H. Selective RGD-Mediated Adhesion of Osteoblasts at Surfaces of Implants. *Angewandte Chemie International Edition*. 1999;38(4):560-562.

KANTLEHNER M., SCHAFFNER P., FINSINGER D., MEYER J., JONCZYK A., DIEFENBACH B., NIES B., HÖLZEMANN G., GOODMAN S.L. and KESSLER H. Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as well as Bone Formation. *ChemBioChem*. 2001;1:107-114.

KARAGEORGIU V. and KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5474-91.

KASEMO B. and GOLD J. Implant surfaces and interface processes. *Advances in Dental Research*. 1999 June 1, 1999;13(1):8-20.

KHORASANI M.T., MOEMENBELLAH S., MIRZADEH H. and SADATNIA B. Effect of surface charge and hydrophobicity of polyurethanes and silicone rubbers on L929 cells response. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006;51(2):112-119.

KIM C.Y., CLARK A.E. and HENCH L.L. Compositional dependence of calcium phosphate layer formation in fluoride Bioglasses. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1992 Sep;26(9):1147-61.

KIM M.S., SHIN Y.N., CHO M.H., KIM S.H., KIM S.K., CHO Y.H., KHANG G., LEE I.W. and LEE H.B. Adhesion Behavior of Human Bone Marrow Stromal Cells on Differentially Wettable Polymer Surfaces. *Tissue Engineering*.0(0).

KLEIN C.L., SCHOLL M. and MAELICKE A. Neuronal networks *in vitro*: formation and organization on biofunctionalized surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1999;10(12):721-727.

KLOSE R., KEMTER E., BEDKE T., BITTMANN I., KELSSER B., ENDRES R., PFEFFER K., SCHWINZER R. and WOLF E. Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation*. 2005 Jul 27;80(2):222-30.

KNESER U., SCHAEFER D.J., POLYKANDRIOTIS E. and HORCH R.E. Tissue Engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2006 Jan-Mar;10(1):7-19.

KOBAYASHI H. and IKADA Y. Corneal cell adhesion and proliferation on hydrogel sheets bound with cell-adhesive proteins. *Current Eye Research*. 1991 Oct;10(10):899-908.

KOCH C.F., JOHNSON S., KUMAR D., JELINEK M., CHRISEY D.B., DORAISWAMY A., JIN C., NARAYAN R.J. and MIHAILESCU I.N. Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27(3):484-494.

KOHN J. and LANGER R. Bioresorbable and bioerodible Materials. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; 1996. p. 64-73.

KON E., MURAGLIA A., CORSI A., BIANCO P., MARCACCI M., MARTIN I., BOYDE A., RUSPANTINI I., CHISTOLINI P., ROCCA M., GIARDINO R., CANCEDDA R. and QUARTO R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000 Mar 5;49(3):328-37.

KONONEN M., HORMIA M., KIVILAHTI J., HAUTANIEMI J. and THESLEFF I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1992;26(10):1325-1341.

KOO L.Y., IRVINE D.J., MAYES A.M., LAUFFENBURGER D.A. and GRIFFITH L.G. Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus. *Journal of Cell Science*. 2002 Apr 1;115(Pt 7):1423-33.

KOTHA S.P., LI C., MCGINN P., SCHMID S.R. and MASON J.J. Improved mechanical properties of acrylic bone cement with short titanium fiber reinforcement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006;V17(12):1403-1409.

KOUVROUKOGLOU S., DEE K.C., BIZIOS R., MCINTIRE L.V. and ZYGOURAKIS K. Endothelial cell migration on surfaces modified with immobilized adhesive peptides. *Biomaterials*. 2000 2000/9;21(17):1725-1733.

KOVEKER G.B., GRAHAM L.M., BURKEL W.E., SELL R., WAKEFIELD T.W., DIETRICH K. and STANLEY J.C. Extracellular matrix preparation of expanded polytetrafluoroethylene grafts seeded with endothelial cells: influence on early platelet deposition, cellular growth, and luminal prostacyclin release. *Surgery*. 1991 Mar;109(3 Pt 1):313-9.

KRETSINGER J.K., HAINES L.A., OZBAS B., PCHAN D.J. and SCHNEIDER J.P. Cytocompatibility of self-assembled [beta]-hairpin peptide hydrogel surfaces. *Biomaterials*. 2005;26(25):5177-5186.

KUBOKI Y., TAKITA H., KOBAYASHI D., TSURUGA E., INOUE M., MURATA M., NAGAI N., DOHI Y. and OHGUSHI H. BMP-Induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998;39(2):190-199.

KUHL P.R. and GRIFFITH-CIMA L.G. Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor-induced stimulation from the solid phase. *Nature Medicine*. 1996;2(9):1022-1027.

KUMAR A. and WHITESIDES G.M. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and

an alkanethiol "ink" followed by chemical etching. Applied Physics Letters. 1993;63(14):2002-2004.

KUNZLER T.P., DROBEK T., SCHULER M. and SPENCER N.D. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. Biomaterials. 2007;28(13):2175-2182.

L'HEUREUX N., STOCLET J.C., AUGER F.A., LAGAUD G.J., GERMAIN L. and ANDRIANTSITOHAINA R. A human tissue-engineered vascular media: a new model for pharmacological studies of contractile responses. Faseb J. 2001 Feb;15(2):515-24.

LAFLAMME K., ROBERGE C.J., POULIOT S., D'ORLEANS-JUSTE P., AUGER F.A. and GERMAIN L. Tissue-engineered human vascular media produced *in vitro* by the self-assembly approach present functional properties similar to those of their native blood vessels. Tissue Engineering. 2006 Aug;12(8):2275-81.

LASCHKE M.W., WITT K., POHLEMANN T. and MENGER M.D. Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: In vivo analysis of biocompatibility and vascularization. Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials. 2007 Feb 5;82B(2):494-505.

LATEEF S.S., BOATENG S., HARTMAN T.J., CROT C.A., RUSSELL B. and HANLEY L. GRGDSP peptide-bound silicone membranes withstand mechanical flexing *in vitro* and display enhanced fibroblast adhesion. Biomaterials. 2002;23(15):3159-3168.

LAUBE H.R., DUWE J., RUTSCH W. and KONERTZ W. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2000 Jul;120(1):134-41.

LAZARE S., SOULIGNAC J.C. and FRAGNAUD P. Direct and accurate measurements of etch rate of polymer films under far-UV irradiation. Applied Physics Letters. 1987;50(10):624-625.

LEBARON R.G. and ATHANASIOU K.A. Extracellular matrix cell adhesion peptides: Functional applications in orthopedic materials. Tissue Engineering. 2000;6(2):85-103.

LEE J.-S., SUGIOKA K., TOYODA K., OFFENHAUSSER A., KNOLL W. and SASABE H. Micropatterning of cultured cells on polystyrene surface by using an excimer laser. Applied Physics Letters. 1994;65(4):400-402.

LEE S.H., KIM B.S., KIM S.H., CHOI S.W., JEONG S.I., KWON I.K., KANG S.W., NIKOLOVSKI J., MOONEY D.J., HAN Y.K. and KIM Y.H. Elastic biodegradable poly(glycolide-co-caprolactone) scaffold for Tissue Engineering. Journal of Biomedical Materials Research A. 2003 Jul 1;66(1):29-37.

LEHNERT D., WEHRLE-HALLER B., DAVID C., WEILAND U., BALLESTREM C., IMHOF B.A. and BASTMEYER M. Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. Journal of Cell Science. 2004 January 1, 2004;117(1):41-52.

LEITAO E., SILVA R.A. and BARBOSA M.A. Electrochemical and surface modifications on N+-ion-implanted 316 L stainless steel. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1997;V8(6):365-368.

LELAH M.D., PIERCE J.A., LAMBRECHT L.K. and COOPER S.L. Polyether--urethane ionomers: surface property/ex vivo blood compatibility relationships. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1985;104(2):422-439.

LEON Y LEON C.A. New perspectives in mercury porosimetry. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1998;76-77:341-372.

LEWANDOWSKA K., PERGAMENT E., SUKENIK C.N. and CULP L.A. Cell-Type-Specific adhesion mechanisms mediated by fibronectin adsorbed to chemically derivatized substrata. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1992;26(10):1343-1363.

LIN H.B., SUN W., MOSHER D.F., GARCÍA-ECHEVERRÍA C., SCHAUFELBERGER K., LELKES P.I. and COOPER S.L. Synthesis, surface, and cell-adhesion properties of polyurethanes containing covalently grafted RGD-peptides. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994;28(3):329-342.

LONG M. and RACK H.J. Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998;19(18):1621-1639.

LOPEZ L.C., GRISTINA R., CECCONE G., ROSSI F., FAVIA P. and D'AGOSTINO R. Immobilization of RGD peptides on stable plasma-deposited acrylic acid coatings for biomedical devices. *Surface and Coatings Technology*. 2005;200(1-4):1000-1004.

LORD M.S., COUSINS B.G., DOHERTY P.J., WHITELOCK J.M., SIMMONS A., WILLIAMS R.L. and MILTHORPE B.K. The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response. *Biomaterials*. 2006 Oct;27(28):4856-62.

MACDONALD D.E., RAPUANO B.E., DEO N., STRANICK M., SOMASUNDARAN P. and BOSKEY A.L. Thermal and chemical modification of titanium-aluminum-vanadium implant materials: effects on surface properties, glycoprotein adsorption, and MG63 cell attachment. *Biomaterials*. 2004;25(16):3135-3146.

MACNEIL S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):874-80.

MAHESHWARI G., BROWN G., LAUFFENBURGER D.A., WELLS A. and GRIFFITH L.G. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *Journal of Cell Science*. 2000;113:1677-1686.

MANGOVSKA B., BOGOEVA-GACEVA G. and POHLERS A. Structure and basic properties of aminated PET. *Journal of Applied Polymer Science*. 1996;62(4):605-612.

MARCACCI M., KON E., MOUKHACHEV V., LAVROUKOV A., KUTEPOV S., QUARTO R., MASTROGIACOMO M. and CANCEDDA R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Engineering*. 2007 May;13(5):947-55.

MARCHAND-BRYNAERT. Biological evaluation of RGD peptidomimetics, designed for the covalent derivatization on cell culture substrata, as potential promoters of cellular adhesion. *Biomaterials*. 1999;20(19):1773-1782.

MARCHAND-BRYNAERT J., DELDIME M., DUPONT I., DEWEZ J.-L. and SCHNEIDER Y.-J. Surface Functionalization of Poly(ethylene terephthalate) Film and Membrane by Controlled Wet Chemistry: Chemical Characterization of Carboxylated Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1995 1995/7;173(1):236-244.

MARCHAND-BRYNAERT J., DELDIME M., DUPONT I., DEWEZ J.L. and SCHNEIDER Y.J. Surface Functionalization of Poly(ethylene terephthalate) Film and Membrane by Controlled Wet Chemistry:next term Chemical Characterization of Carboxylated Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1995;173(1):236-244.

MARSICH E., BORGOGNA M., DONATI I., MOZETIC P., STRAND B.L., SALVADOR S.G., VITTUR F. and PAOLETTI S. Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: A bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation. *Journal of Biomedical Materials Research A*. 2007 Jul 6.

MARTIN KANTLEHNER P.S., DIRK FINSINGER, JÖRG MEYER, ALFRED JONCZYK, BEATE DIEFENBACH, BERTHOLD NIES, GÜNTER HÖLZEMANN, SIMON L. GOODMAN, HORST KESSLER. Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as well as Bone Formation. *ChemBioChem*. 2001;1:107-114.

MARTINS C.L., RATNER B.D. and BARBOSA M.A. Protein adsorption on mixtures of hydroxyl- and methyl-terminated alkanethiols self-assembled monolayers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;67A(1):158-171.

MASSARO C., BAKER M.A., COSENTINO F., RAMIRES P.A., KLOSE S. and MILELLA E. Surface and biological evaluation of hydroxyapatite-based coatings on titanium deposited by different techniques. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;58(6):651-7.

MASSIA S. and HUBBELL J. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3- mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *Journal of Cell Biology*. 1991;114:1089-1100.

MASSIA S.P. and HUBBELL J.A. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1991;25(2):223-242.

MASSIA S.P. and HUBBELL J.A. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3- mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *Journal of Cell Biology*. 1991 1991;114:1089-1100.

MASSIA S.P. and HUBBELL J.A. Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin alpha 4 beta 1. *Journal of Biological Chemistry*. 1992 Jul 15;267(20):14019-26.

MEINHART J.G., DEUTSCH M., FISCHLEIN T., HOWANIETZ N., FROSCHL A. and ZILLA P. Clinical autologous *in vitro* endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Annals of Thoracic Surgery*. 2001 May;71(5 Suppl):S327-31.

MESA J.M., ZAPOROJAN V., WEINAND C., JOHNSON T.S., BONASSAR L., RANDOLPH M.A., YAREMCHUK M.J. and BUTLER P.E. Tissue Engineering cartilage with aged articular chondrocytes *in vivo*. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006 Jul;118(1):41-9; discussion 50-3.

MESTRIES P., BORCHIELLINI C., BARBAUD C., DUCHESNAY A., ESCARTIN Q., BARRITAU D., CARUELLE J.P. and KERN P. Chemically modified dextrans modulate expression of collagen phenotype by cultured smooth muscle cells in relation to the degree of carboxymethyl, benzylamide, and sulfation substitutions. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998;42(2):286-294.

METCALFE A.D. and FERGUSON M.W. Tissue Engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the Royal Society Interface*. 2007 Jun 22;4(14):413-37.

MORISHITA T., HONOKI K., OHGUSHI H., KOTOBUKI N., MATSUSHIMA A. and TAKAKURA Y. Tissue Engineering Approach to the Treatment of Bone Tumors: Three Cases of Cultured Bone Grafts Derived From Patients Mesenchymal Stem Cells. *Artificial Organs*. 2006;30(2):115-118.

MORPURGO M., BAYER E.A. and WILCHEK M. N-hydroxysuccinimide carbonates and carbamates are useful reactive reagents for coupling ligands to lysines on proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1999;38(1):17-28.

MOUGENOT P., KOCH M., DUPONT I.I., SCHNEIDER Y.J. and MARCHAND-BRYNAERT J. Surface Functionalization of Polyethylene Terephthalate Film and Membranes by Controlled Wet Chemistry. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1996 Jan 15;177(1):162-170.

MRKSICH M., DIKE L.E., TIEN J., INGBER D.E. and WHITESIDES G.M. Using Microcontact Printing to Pattern the Attachment of Mammalian Cells to Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Transparent Films of Gold and Silver. *Experimental Cell Research*. 1997;235(2):305-313.

MUELLER R.J. Biological degradation next term of synthetic polyesters—previous Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry* 2006;41(10):2124-2128.

NAG S., BANERJEE R. and FRASER H.L. A novel combinatorial approach for understanding microstructural evolution and its relationship to mechanical properties in metallic biomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2007;3(3):369-376.

NAKAO A., KAIBARA M., IWAKI M., SUZUKI Y. and KUSAKABE M. XPS and SERS Studies of Cell Adhesion-controlled Polymer Modified by Ion Implantation. *Surface and Interface Analysis*. 1996;24(4):252-256.

NEFF J.A., CALDWELL K.D. and TRESKO P.A. A novel method for surface modification to promote cell attachment to hydrophobic substrates. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998;40(4):511-519.

NEFF J.A., TRESKO P.A. and CALDWELL K.D. Surface modification for controlled studies of cell-ligand interactions. *Biomaterials*. 1999;20(23-24):2377-2393.

NISSEN K.E., STEVENS M.G., STUART B.H. and BAKER A.T. Characterization of PET films modified by tetraethylenepentamine (TTEPA). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2001;39(6):623-633.

OGINO M., OHUCHI F. and HENCH L.L. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1980 Jan;14(1):55-64.

OHGUSHI H., GOLDBERG V.M. and CAPLAN A.I. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1989 Jun;60(3):334-9.

OKAMOTO M., DOHI Y., OHGUSHI H., SHIMAOKA H., IKEUCHI M., MATSUSHIMA A., YONEMASU K. and HOSOI H. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on *in vitro* and *in vivo* bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006 Apr;17(4):327-36.

OLIVA A.A., JAMES C.D., KINGMAN C.E., CRAIGHEAD H.G. and BANKER G.A. Patterning Axonal Guidance Molecules Using a Novel Strategy for Microcontact Printing. *Neurochemical Research*. 2003;28(11):1639-1648.

OLIVEIRA J.T., CRAWFORD A., MUNDY J.M., MOREIRA A.R., GOMES M.E., HATTON P.V. and REIS R.L. A cartilage Tissue Engineering approach combining starch-polycaprolactone fibre mesh scaffolds with bovine articular chondrocytes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007 Feb;18(2):295-302.

OTTO M., KRIEGSMANN J., GEHRKE T. and BERTZ S. Wear particles: key to aseptic prosthetic loosening? *Pathologie*. 2006 Nov;27(6):447-60.

OZAWA T., MICKLE D.A., WEISEL R.D., KOYAMA N., OZAWA S. and LI R.K. Optimal biomaterial for creation of autologous cardiac grafts. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I176-82.

PALLU S., BOURGET C., BAREILLE R., LABRUGERE C., DARD M., SEWING A., JONCZYK A., VERNIZEAU M., CHRISTINE DURRIEU M. and AMEDEE-VILAMITJANA J. The effect of cyclo-DfKRG peptide immobilization on titanium on the adhesion and differentiation of human osteoprogenitor cells. *Biomaterials*. 2005 2005/12;26(34):6932-6940.

PARNIAK M.A., LANGE G. and VISWANATHA T. Quantitative determination of monosubstituted guanidines: A comparative study of different procedures. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1983;7(4):267-276.

- PELISSIER P., VILLARS F., MATHOULIN-PELISSIER S., BAREILLE R., LAFAGE-PROUST M.H. and VILAMITJANA-AMEDEE J. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2003 May;111(6):1932-41.
- PELLED G., G T., ASLAN H., GAZIT Z. and GAZIT D. Mesenchymal stem cells for bone gene therapy and Tissue Engineering. *Current Pharmaceutical Design*. 2002;8(21):1917-28.
- PETITE H., VIATEAU V., BENSALD W., MEUNIER A., DE POLLAK C., BOURGUIGNON M., OUDINA K., SEDEL L. and GUILLEMIN G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotechnology*. 2000 Sep;18(9):959-63.
- PIERSCHBACHER M.D. and RUOSLAHTI E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 1984;309(5963):30-33.
- PIERSCHBACHER M.D. and RUOSLAHTI E. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*. 1987 Dec 25;262(36):17294-8.
- PONSONNET L., COMTE V., OTHMANE A., LAGNEAU C., CHARBONNIER M., LISSAC M. and JAFFREZIC N. Effect of surface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel-titanium substrates. *Materials Science and Engineering: C*. 2002;21(1-2):157-165.
- POPAT K.C., CHATVANICHKUL K.I., BARNES G.L., LATEMPA T.J.J., GRIMES G.A. and DESAI T.A. Osteogenic differentiation of marrow stromal cells cultured on nanoporous alumina surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007;80A(4):955-964.
- PORTE-DURRIEU M.C., GUILLEMOT F., PALLU S., LABRUGERE C., BROUILLAUD B., BAREILLE R., AMEDEE J., BARTHE N., DARD M. and BAQUEY C. Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials*. 2004 2004/8;25(19):4837-4846.
- PORTÉ-DURRIEU M.C., LABRUGÈRE C., VILLARS F., LEFEBVRE F., DUTOYA S., GUETTE A., BORDENAVE L. and BAQUEY C. Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces: XPS characterization and human endothelial cell interactions. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999;46(3):368-375.
- PRADEL W., ECKELT U. and LAUER G. Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*. 2006 Mar;101(3):285-90.
- PULEO D.A., KISSLING R.A. and SHEU M.S. A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials*. 2002 May;23(9):2079-87.
- QUARTO R., MASTROGIACOMO M., CANCEDDA R., KUTEPOV S.M., MUKHACHEV V., LAVROUKOV A., KON E. and MARCACCI M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England Journal of Medicine*. 2001 Feb 1;344(5):385-6.

QUIRK R.A., CHAN W.C., DAVIES M.C., TENDLER S.J.B. and SHAKESHEFF K.M. Poly(-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid). *Biomaterials*. 2001;22(8):865-872.

REZANIA A. and HEALY K.E. The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000 03/10/2000;52(4):595-600.

RHEINWALD J.G. and GREEN H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*. 1975 Nov;6(3):317-30.

RIBEIRO C.C., BARRIAS C.C. and BARBOSA M.A. Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006 May;17(5):455-63.

RINGEISEN B.R., CHRISEY D.B., PIQUE A., YOUNG H.D., MODI R., BUCARO M., JONES-MEEHAN J. and SPARGO B.J. Generation of mesoscopic patterns of viable *Escherichia coli* by ambient laser transfer. *Biomaterials*. 2002;23(1):161-166.

RINGEISEN B.R., WU P.K., KIM H., PIQUE A., AUYEUNG R.Y.C., YOUNG H.D., CHRISEY D.B. and KRIZMAN D.B. Picoliter-Scale Protein Microarrays by Laser Direct Write. *Biotechnology Progress*. 2002;18(5):1126-1129.

RODRIGUES S.N., GONCALVES I.C., MARTINS M.C.L., BARBOSA M.A. and RATNER B.D. Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers. *Biomaterials*. 2006;27(31):5357-5367.

ROSA A.L., BELOTI M.M., VAN NOORT R., HATTON P.V. and DEVLIN A.J. Surface topography of hydroxyapatite affects ROS17/2.8 cells response. *Pesquisa odontologica brasileira = Brazilian oral research*. 2002;16(3):209-215.

RUOSLAHTI E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1996;12(1):697-715.

RUOSLAHTI E. and PIERSCHBACHER M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987;238(4826):491-497.

RYAN E.A., LAKEY J.R. and SHAPIRO A.M. Clinical results after islet transplantation. *Journal of investigative medicine*. 2001 Nov;49(6):559-62.

SAKIYAMA-ELBERT S.E. and HUBBELL J.A. FUNCTIONAL BIOMATERIALS: Design of Novel Biomaterials. *Annual Review of Materials Research*. 2001;31(1):183-201.

SALACINSKI P.R.P., MCLEAN C., SYKES J.E.C., CLEMENT-JONES V.V. and LOWRY P.J. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3[alpha],6[alpha]-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Analytical Biochemistry*. 1981;117(1):136-146.

SASTRY S.K. and BURRIDGE K. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Experimental Cell Research*. 2000 Nov 25;261(1):25-36.

SCHIEKER M., SEITZ S., GULKAN H., NENTWICH M., HORVATH G., REGAUER M., MILZ S. and MUTSCHLER W. Tissue Engineering of bone. Integration and migration of human mesenchymal stem cells in colonized constructs in a murine model. *Orthopade*. 2004 Dec;33(12):1354-60.

SCHNEIDER S., FEILEN P.J., BRUNNENMEIER F., MINNEMANN T., ZIMMERMANN H., ZIMMERMANN U. and WEBER M.M. Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice. *Diabetes*. 2005 Mar;54(3):687-93.

SCHOLL M., SPROSSLER C., DENYER M., KRAUSE M., NAKAJIMA K., MAELICKE A., KNOLL W. and OFFENHAUSSER A. Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces. *Journal of Neuroscience Methods*. 2000;104(1):65-75.

SCHULZ R.M. and BADER A. Cartilage Tissue Engineeringengineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *European Biophysics Journal*. 2007 Apr;36(4-5):539-68.

SCHWARTZ M.A. Integrin signaling revisited. *Trends in Cell Biology*. 2001;11(12):466-470.

SEEGER J.M. and KLINGMAN N. Improved in vivo endothelialization of prosthetic grafts by surface modification with fibronectin. *Journal of Vascular Surgery*. 1988 Oct;8(4):476-82.

SHAPIRO A.M.J., RYAN E.A. and LAKEY J.R.T. Clinical islet transplant--state of the art. *Transplantation Proceedings*. 2001;33(7-8):3502-3503.

SHUM-TIM D., STOCK U., HRKACH J., SHINOKA T., LIEN J., MOSES M.A., STAMP A., TAYLOR G., MORAN A.M., LANDIS W., LANGER R., VACANTI J.P. and MAYER J.E. Tissue Engineeringengineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1999;68(6):2298-2304.

SINGHVI R., KUMAR A., LOPEZ G.P., STEPHANOPOULOS G.N., WANG D.I., WHITESIDES G.M. and INGBER D.E. Engineering cell shape and function. *Science*. 1994 April 29, 1994;264(5159):696-698.

SKARJA G.A. and BRASH J.L. Physicochemical properties and platelet interactions of segmented polyurethanes containing sulfonate groups in the hard segment. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997;34(4):439-455.

SPERLING C., SCHWEISS R.B., STRELLER U. and WERNER C. *In vitro* hemocompatibility of self-assembled monolayers displaying various functional groups. *Biomaterials*. 2005;26(33):6547-6557.

SPIJKER H.T., BUSSCHER H.J. and VAN OEVEREN W. Influence of abciximab on the adhesion of platelets on a shielded plasma gradient prepared on polyethylene. *Thrombosis Research*. 2002;108(1):57-62.

STOCLET J.C., LAFLAMME K., AUGER F.A. and GERMAIN L. Human blood vessels created with Tissue Engineering. *Medecine/Science*. 2004 Jun-Jul;20(6-7):675-8.

STORY B.J., WAGNER W.R., GAISSER D.M., COOK S.D. and RUST-DAWICKI A.M. In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* . 1998 Nov-Dec;13(6):749-57.

TADEUSZ S., EWA F., STANISLAWA S. and MICHAL K. Aminolysis and aminoglycolysis of waste poly(ethylene terephthalate). *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 2001;V3(1):24-31.

TAM J.P., YU Q. and MIAO Z. Orthogonal ligation strategies for peptide and protein. *Peptide Science*. 1999;51(5):311-332.

TAN A.K. Current and emerging treatments in Parkinson's disease. *The Annals Academy of Medicine Singapore*. 2001 Mar;30(2):128-33.

TASHIRO H., IWATA H., WARNOCK G.L., TANIGAWA M., OTOTANI Y. and TSUJI T. Functional assessment of microencapsulated porcine islets with agarose polystyrene sulfonic acid *in vitro* and in xenotransplantation. *Transplantation Proceedings*. 2005 Oct;37(8):3512-3.

TAYLOR H. and MINGER S.L. Regenerative medicine in Parkinson's disease: generation of mesencephalic dopaminergic cells from embryonic stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005 Oct;16(5):487-92.

TEEBKEN O.E., PUSCHMANN C., APER T., HAVERICH A. and MERTSCHING H. Tissue-engineered bioprosthetic venous valve: a long-term study in sheep. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2003 Apr;25(4):305-12.

THISSEN H., HAYES J.P., KINGSHOTT P., JOHNSON G., HARVEY E.C. and GRIESSER H.J. Nanometer thickness laser ablation for spatial control of cell attachment. *Smart Materials and Structures*. 2002;11(5):792.

VAN DER FLIER A. and SONNENBERG A. Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research*. 2001;305(3):285-298.

VAN DER PLUIJM G., VLOEDGRAVEN H.J.M., IVANOV B., ROBEY F.A., GRZESIK W.J., ROBEY P.G., PAPAPOULOS S.E. and LOWIK C.W.G.M. Bone Sialoprotein Peptides Are Potent Inhibitors of Breast Cancer Cell Adhesion to Bone. *Cancer Research*. 1996 April 15, 1996;56(8):1948-1955.

VAN WACHEM P.B., BEUGELING T., FEIJEN J., BANTJES A., DETMERS J.P. and VAN AKEN W.G. Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials*. 1985;6(6):403-408.

VAN WACHEM P.B., HOGT A.H., BEUGELING T., FEIJEN J., BANTJES A., DETMERS J.P. and VAN AKEN W.G. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials*. 1987;8(5):323-328.

VARANI J., INMAN D.R., FLIGIEL S.E.G. and HILLEGAS W.J. Use of recombinant and synthetic peptides as attachment factors for cells on microcarriers. *Cytotechnology*. 1993;13(2):89-98.

VASIL'EV A.V., MAKAROV P.V., ROGOVAIA O.S., GUNDOROVA R.A. and TERSKIKH V. [Repair of corneal defects using Tissue Engineering. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 2005 Jan-Feb(1):5-8.

VEISEH M., WICKES B.T., CASTNER D.G. and ZHANG M. Guided cell patterning on gold-silicon dioxide substrates by surface molecular engineering. *Biomaterials.* 2004;25(16):3315-3324.

VERRIER S., PALLU S., BAREILLE R., JONCZYK A., MEYER J., DARD M. and AMEDEE J. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials.* 2002 Jan;23(2):585-96.

VILLARS F., BORDENAVE L., BAREILLE R. and AMEDEE J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *Journal of Cellular Biochemistry.* 2000 Sep 14;79(4):672-85.

VINATIER C., GUICHEUX J., DACULSI G., LAYROLLE P. and WEISS P. Cartilage and bone Tissue Engineering using hydrogels. *Biomedical Materials and Engineering.* 2006;16(4 Suppl):S107-13.

WAHL F. and MUTTER M. Analogues of oxytocin with an oxime bridge using chemoselectively addressable building blocks. *Tetrahedron Letters.* 1996;37(38):6861-6864.

WALLUSCHECK K.P., STEINHOFF G., KELM S. and HAVERICH A. Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 1996 Oct;12(3):321-30.

WANG J., LAYROLLE P., STIGTER M. and DE GROOT K. Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment. *Biomaterials.* 2004 Feb;25(4):583-92.

WANG J., PAN C.J., HUANG N., SUN H., YANG P., LENG Y.X., CHEN J.Y., WAN G.J. and CHU P.K. Surface characterization and blood compatibility of poly(ethylene terephthalate) modified by plasma surface grafting. *Surface and Coatings Technology.* 2005;196(1-3):307-311.

WASHBURN N.R., YAMADA K.M., SIMON C.G., KENNEDY S.B. and AMIS E.J. High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation. *Biomaterials.* 2004;25(7-8):1215-1224.

WEBB K., HLADY V. and TRESKO P.A. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1998;41(3):422-430.

WEBSTER T.J., ERGUN C., DOREMUS R.H., SIEGEL R.W. and BIZIOS R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2000 Sep 5;51(3):475-83.

WEBSTER T.J., SIEGEL R.W. and BIZIOS R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials.* 1999;20(13):1221-1227.

WEI J., YOSHINARI M., TAKEMOTO S., HATTORI M., KAWADA E., LIU B. and ODA Y. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007;81B(1):66-75.

WHITESIDES G.M., FERGUSON G.S., ALLARA D., SCHERSON D., SPEAKER L. and ULMAN A. Organized molecular assemblies. *Critical Reviews in Surface Chemistry*. 1993;3(1):49-65.

WILLIAMS S.K., SCHNEIDER T., KAPELAN B. and JARRELL B.E. Formation of a functional endothelium on vascular grafts. *Journal of Electron Microscopy Technique*. 1991;19(4):439-451.

WIRTH C., COMTE V., LAGNEAU C., EXBRAYAT P., LISSAC M., JAFFREZIC-RENAULT N. and PONSONNET L. Nitinol surface roughness modulates *in vitro* cell response: a comparison between fibroblasts and osteoblasts. *Materials Science and Engineering: C*. 2005;25(1):51-60.

WONG C., INMAN E., SPAETHE R. and HELGERSON S. Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003 Mar;89(3):573-82.

WONG C.S., SGARIOTO M., OWIDA A.A., YANG W., ROSENFELDT F.L. and MORSI Y.S. Polyethyleneterephthalate Provides Superior Retention of Endothelial Cells During Shear Stress Compared to Polytetrafluoroethylene and Pericardium. *Heart, Lung and Circulation*. 2006;15(6):371-377.

WU X., RABKIN-AIKAWA E., GULESERIAN K.J., PERRY T.E., MASUDA Y., SUTHERLAND F.W., SCHOEN F.J., MAYER J.E., JR. and BISCHOFF J. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2004 Aug;287(2):H480-7.

XIAO S.-J., TEXTOR M., SPENCER N.D. and SIGRIST H. Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces. *Langmuir*. 1998 1998/9/15;14(19):5507-5516.

XIAO S.J., TEXTOR M., SPENCER N.D., WIELAND M., KELLER B. and SIGRIST H. Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1997;8(12):867-872.

XIONG M., AI Y.F. and WANG Y. [Reconstruction of Tissue Engineering vascular model *in vitro*]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2001 Mar;15(2):109-12.

XU B.Y., YANG H., SERREZE D.V., MACINTOSH R., YU W. and WRIGHT J.R., JR. Rapid destruction of encapsulated islet xenografts by NOD mice is CD4-dependent and facilitated by B-cells: innate immunity and autoimmunity do not play significant roles. *Transplantation*. 2005 Aug 15;80(3):402-9.

- XU C.Y., INAI R., KOTAKI M. and RAMAKRISHNA S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*. 2004;25(5):877-886.
- XU H.H., WEIR M.D., BURGUERA E.F. and FRASER A.M. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials*. 2006 Aug;27(24):4279-87.
- YAMAOKA T., HOTTA Y., KOBAYASHI K. and KIMURA Y. Synthesis and properties of malic acid-containing functional polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999;25(1-3):265-271.
- YANG H., YANG K. and ZHANG B. Pitting corrosion resistance of La added 316L stainless steel in simulated body fluids. *Materials Letters*. 2007;61(4-5):1154-1157.
- YILMAZ E. Chitosan: a versatile biomaterial. *Advances in experimental medicine and biology*. 2004;553:59-68.
- YOSHIKAWA H. and MYOUI A. Bone Tissue Engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of Artificial Organs*. 2005;8(3):131-6.
- ZHANG Z., WANG Z., LIU S. and KODAMA M. Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses. *Biomaterials*. 2004;25(1):177-187.
- ZHU B., EURELL T., GUNAWAN R. and LECKBAND D. Chain-length dependence of the protein and cell resistance of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;56(3):406-416.
- ZILLA P., DEUTSCH M., MEINHART J., PUSCHMANN R., EBERL T., MINAR E., DUDCZAK R., LUGMAIER H., SCHMIDT P., NOSZIAN I. and *ET AL*. Clinical *in vitro* endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years. *Journal of Vascular Surgery*. 1994 Mar;19(3):540-8.
- ZILLA P., FASOL R., DUDECK U., SIEDLER S., PREISS P., FISCHLEIN T., MULLER-GLAUSER W., BAITELLA G., SANAN D., ODELL J. and *ET AL*. In situ cannulation, microgrid follow-up and low-density plating provide first passage endothelial cell masscultures for *in vitro* lining. *Journal of Vascular Surgery*. 1990 Aug;12(2):180-9.
- ZINGER O., ANSELME K., DENZER A., HABERSETZER P., WIELAND M., JEANFILS J., HARDOUIN P. and LANDOLT D. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials*. 2004;25(14):2695-2711.
- ZREIQAT H., EVANS P. and HOWLETT C.R. Effect of surface chemical modification of bioceramic on phenotype of human bone-derived cells. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999 Mar 15;44(4):389-96.